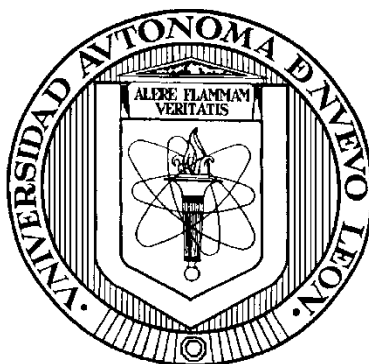


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DE UN NANOVECTOR GRAFÉNICO MODIFICADO CON
HIALURONATO PARA LA ENTREGA DE CARBOPLATINO Y SU EFECTO EN
UN MODELO MURINO DE CÁNCER.**

Por

M.C. DANIEL SALAS TREVIÑO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de Doctorado
en Ciencias con Orientación en Morfología**

JULIO/2020

Análisis de un nanovector grafénico modificado con hialuronato para la entrega de carboplatino y su efecto en un modelo murino de cáncer.

Aprobación de la Tesis:



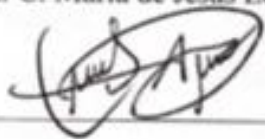
Director
Dr. C. Adolfo Soto Domínguez



Codirector de la Tesis
Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas



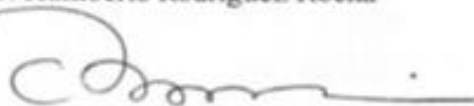
Comisión de Tesis
Dra. C. María de Jesús Loera Arias



Comisión de Tesis
Dra. C. Aracely García García



Comisión de Tesis
Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha



Subdirector de Estudios de Posgrado
Dr. Med. Felipe Arturo Martínez Morales

AGRADECIMIENTOS

Dicen que cuando estás disfrutando lo que haces el tiempo pasa rapidísimo, y sin duda este ha sido el caso. Son 4 años que han pasado volando, llenos de retos, aventuras, alegrías y tristezas, todo parte de esta vida en la cual no se puede dar por sentado ni una simple cosa.

En la primera persona en quien pienso al escribir mis agradecimientos por este logro es definitivamente mi padre, el Dr. Noé Salas Piña, quien nos dejó recientemente para descansar eterna y tranquilamente. Para mí, él siempre fue una persona admirable tanto en el sentido paternal como en el profesional, bajo su protección, nunca nos faltó techo ni comida en la mesa, trabajaba todos los días hasta el cansancio para ello y estoy completamente seguro de que se fue satisfecho de todo lo que dejó acá. Era un gran médico, comprometido con la profesión y con sus pacientes, mucha gente nos demostró sus condolencias al momento de enterarse de su partida y ello solo habla del excelente estima y prestigio que tenía en la comunidad. Nunca olvidaré todas las enseñanzas que me impartió principalmente con su ejemplo, su cariño era muy especial y único para mí, y siempre lo llevaré conmigo. Este logro te lo dedico especialmente a ti papá, gracias por hacerme llegar hasta aquí, sin ti, nada de esto se habría hecho. Siempre estarás conmigo. Te amaré siempre.

Así mismo, tengo mucho que agradecer a mi esposa Judith, con quien me casé durante el transcurso de mi doctorado. Ella, que ha estado día con día a mi lado, escuchándome y apoyándome incondicionalmente. Es una bendición tenerte en mi vida. Gracias por tu amor, este camino apenas empieza y soy muy feliz de saber que lo recorreremos juntos.

Mi familia, mi madre, que al igual que mi padre, son los pilares de mi vida. Gracias, mamá por haberme educado de la forma en que lo hiciste, ustedes forjaron mucho de lo que hoy soy y siempre estaré eternamente agradecido con ustedes por eso. Te amo mucho mamá, eres una persona muy especial en mi vida. Gracias por estar ahí siempre para mí. Además, mi hermano Noé, a quien siempre le he tenido un respeto y admiración, me da mucho orgullo ver todo lo que has logrado, la gran familia que has formado al lado de Edith y mis sobrinas; gracias por tus acciones, las cuales me alientan a ser mejor día con día y sé que siempre estarás ahí para apoyarme.

Por otra parte, en el ámbito académico, tengo que agradecer muchísimo a mi maestro, mi mentor, mi amigo, el Dr. Adolfo Soto Domínguez. Gracias por todas las enseñanzas que me impartió, por siempre estar ahí para solucionar los problemas que se pudieran presentar. Estoy seguro de que este logro es uno de muchos de esta relación. Siempre estaré agradecido por adoptarme como su estudiante y nunca dejarme a mi suerte. El haberlo elegido mi asesor es una decisión de las mejores que he tomado. Lo admiro profundamente.

A mi comisión de tesis, la Dra. Odila Saucedo, Dra. María de Jesús Loera, Dra. Aracely García y el Dr. Humberto Rodríguez, por siempre estar al pendiente de mi trabajo de tesis y ayudarme a consolidar este estudio.

A mis estimados compañeros del laboratorio, Abi, Ale, Ana, Yareth, Alfredo, Adrián, José Juan, Sheila y David “El perraczo”. Sin ustedes los días en el laboratorio no habrían tenido el mismo sabor, aprecio mucho nuestra amistad y todos los consejos brindados.

A mis entrañables amigos de mi carrera, Briones, Toro, Pake, Richie, Jaime y Charlie, que siempre han estado ahí para compartir nuestras vidas, son personas que valoro mucho y estoy orgulloso de tener su amistad.

Por último, agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Facultad de Medicina y mi querida Universidad Autónoma de Nuevo León, por siempre buscar el desarrollo de capital humano en el sentido de la investigación científica de México y apoyarme a consolidar este trabajo.

RESUMEN

M.C. Daniel Salas Treviño

Fecha de disertación: Julio, 2020

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título: Análisis de un nanovector grafénico modificado con hialuronato para la entrega de carboplatino y su efecto en un modelo murino de cáncer.

Candidato para obtener el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Morfología.

Número de páginas: 153

Área de estudio: Nanomedicina

Propósito y Método de Estudio: El cáncer es una de las enfermedades más mortales a nivel mundial actualmente, se estima que una de cada seis muertes es atribuida a esta patología. Los antineoplásicos son fármacos para tratar los casos avanzados de cáncer, sin embargo, muchas veces su administración representa un riesgo al provocar toxicidad sistémica con efectos secundarios severos que afectan la calidad de vida del paciente e incrementan los gastos hospitalarios. El carboplatino, es un fármaco muy utilizado en diversos tipos de cáncer y posee un perfil tóxico importante, por lo que se buscan estrategias para optimizar su entrega y metabolismo. En los últimos años, la nanomedicina ha sido punta de lanza en la investigación farmacológica para encontrar sistemas de entrega de fármacos. En este sentido, los nanotubos de carbono se destacan por su capacidad fisicoquímica para ser funcionalizados y cargados con fármacos. En este estudio diseñamos, caracterizamos y probamos en modelos de cáncer murino *in vitro* e *in vivo* un nanovector basado en nanotubos de carbono, funcionalizado con hialuronato y cargado con carboplatino, para medir su eficiencia y seguridad como un potencial sistema terapéutico del cáncer. Este es un estudio descriptivo, experimental y prospectivo.

Contribuciones y Conclusiones: Se obtuvo un nanovector basado en nanotubos de carbono, funcionalizado con hialuronato y cargado con carboplatino. Demostramos la presencia del ácido hialurónico en las paredes de los nanotubos de carbono mediante métodos fisicoquímicos y espectroscópicos. Además, fuimos capaces de encontrar el carboplatino en la zona del hueco interno mediante microscopía electrónica. Por otra parte, encontramos que los nanovectores poseen una actividad citotóxica específica contra células tumorales. Adicionalmente, se comprobó que la internalización de estos nanovectores fue mayor en células tumorales, lo que se correlaciona con su efecto citotóxico, y que este proceso se asocia al incremento de receptores de ácido hialurónico. Por último, demostramos la bioseguridad que poseen los nanovectores en un modelo *in vivo*, al probar que la administración intratumoral no afecta de manera significativa otros órganos vitales, ni causa inflamación o falla orgánica. En conjunto, toda esta evidencia sostiene que los nanovectores funcionalizados con ácido hialurónico y cargados con carboplatino representan un potencial sistema terapéutico contra el cáncer.



Asesor: Dr. C. Adolfo Soto Domínguez

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	iii
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 EL CÁNCER.....	2
1.2 TRATAMIENTO DEL CÁNCER	2
1.3 NANOMEDICINA.....	5
1.4 NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs).....	6
1.4.1 Generalidades de los CNTs.	6
1.4.2 Toxicidad biológica de los CNTs.....	7
1.4.3 Funcionalización y Biocompatibilidad de los CNTs	9
1.4.4 Los CNTs como herramienta para entrega de fármacos.	10
1.5 FÁRMACOS PLATINADOS.....	12
1.5.1 Generalidades de los fármacos platinados.....	12
1.5.2 Toxicidad de los fármacos platinados	13
1.4 ANTECEDENTES EN EL USO DE CNTs COMO SISTEMA DE ENTREGA DE FÁRMACOS PLATINADOS.....	14
1.4.1 Características morfológicas de los CNTs para su uso en sistemas de entrega de fármacos platinados.	14
1.4.2 Funcionalización en los CNTs para entrega de fármacos platinados.....	15

1.4.3 Carga del fármaco en los CNTs y tipos de fármacos platinados usados	16
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVO GENERAL	25
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	27
6.1 MATERIALES.....	27
6.1.1. Equipos utilizados	27
6.1.2. Reactivos y materiales de laboratorio utilizados.....	27
6.1.3 Especímenes de origen biológico.....	28
6.2 MÉTODOS	28
6.2.1. Construcción de los nanovectores.....	28
6.2.2. Caracterización de los CNTs mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopía infrarroja (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA) e índice de hidrofobicidad.....	30
6.2.3. Cultivo celular.....	32
6.2.4. Análisis de la citotoxicidad <i>in vitro</i> mediante el ensayo de MTT y el ensayo de tinción nuclear por DAPI.	32
6.2.5. Análisis del estrés oxidativo en respuesta a los CNTs <i>in vitro</i>	33

6.2.6. Análisis de la presencia del receptor del HA (CD44) en las líneas celulares tumorales (TC-1) y no tumorales (NIH/3T3) murinas mediante inmunofluorescencia.	34
6.2.7 Evaluación de la selectividad de los CNTs en líneas celulares tumorales y no tumorales murinas mediante morfometrías con microscopía de luz y TEM.....	35
6.2.8 Desarrollo del modelo murino de cáncer para los tratamientos con CNTs.	36
6.2.9 Análisis histológico.	38
6.2.10 Análisis estadístico	38
7. RESULTADOS	41
7.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FISICOQUÍMICA DE LOS NANOVECTORES.....	41
7.1.1. Evaluación morfológica de los nanovectores mediante microscopia electrónica de transmisión.	41
7.1.2. Determinación de la composición química cualitativa de los nanovectores mediante espectroscopia infrarroja (FTIR).	43
7.1.3 Evaluación semi-cuantitativa de la composición orgánica de los nanovectores mediante termogravimetría.....	44
7.1.4 Análisis del índice de hidrofobicidad de los nanovectores mediante extracción líquido – líquido.....	46
7.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO <i>IN VITRO</i> DE LOS NANOVECTORES.....	48

7.2.1	Análisis de la citotoxicidad de los nanovectores en las células tumorales y no tumorales mediante el ensayo de MTT.	48
7.2.2	Análisis del efecto citotóxico de los nanovectores mediante el ensayo del contraste nuclear con DAPI.....	51
7.2.3	Análisis del estrés oxidativo en respuesta a los nanovectores.	54
7.3	EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD ESPECÍFICA DE LOS NANOVECTORES <i>IN VITRO</i>	55
7.3.1	Análisis de la presencia del receptor de ácido hialurónico (CD44) en las líneas celulares tumoral y no tumoral mediante la técnica de inmunofluorescencia.....	55
7.3.2	Análisis de la selectividad de los nanovectores <i>in vitro</i> mediante morfometría con microscopía de luz.	57
7.3.3	Evaluación de la selectividad de los nanovectores <i>in vitro</i> mediante morfometría con microscopia electrónica de transmisión.....	59
7.4	EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DEL EFECTO ANTINEOPLÁSICO DE LOS NANOVECTORES.	62
7.4.1	Análisis del efecto antitumoral de los nanovectores mediante la medición de los animales y de los tumores extirpados.	62
7.4.2	Evaluación de la eficacia antitumoral de los nanovectores mediante análisis histopatológicos de los tumores con microscopía de luz.	63
7.4.3	Evaluación de la seguridad terapéutica de los nanovectores mediante análisis histopatológicos de los órganos vitales de los murinos.	68
8.	DISCUSIÓN.....	77

9. CONCLUSIONES	97
10. PERSPECTIVAS	99
11. BIBLIOGRAFÍA	102
ANEXOS.....	122
APENDICE A - PROCEDIMIENTOS	122
APENDICE B - SOLUCIONES	125
APENDICE C – CURRÍCULUM VITAE	131

LISTA DE TABLAS

Tabla VII – I. Esquemas de tratamiento administrados a los grupos de estudio del modelo murino.

LISTA DE FIGURAS

Figura 7.1 Caracterización ultraestructural de los nanovectores mediante TEM

Figura 7.2 Caracterización de los nanovectores mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier de los nanovectores

Figura 7.3 Curvas de descomposición térmica y de escaneo diferencial calorimétrico de los nanovectores.

Figura 7.4 Índice de hidrofobicidad de los nanovectores

Figura 7.5 Micrografías representativas del efecto citotóxico causado por los CNTs en los cultivos celulares.

Figura 7.6 Reducción de la viabilidad de las células tumorales causada por el nanovector final observada mediante el ensayo de MTT.

Figura 7.7 Micrografías representativas del efecto citotóxico de los nanovectores con la tinción nuclear de DAPI.

Figura 7.8 Reducción de la viabilidad de las células tumorales causada por el nanovector final observada mediante DAPI.

Figura 7.9 Cuantificación del estrés oxidativo en respuesta a los nanovectores en células tumorales y no tumorales.

Figura 7.10 Análisis por inmunofluorescencia para detectar el receptor CD44 en células tumorales y no tumorales.

Figura 7.11 Evaluación de la endocitosis de los nanovectores por microscopía de luz con cortes semifinos.

Figura 7.12 Micrografías electrónicas de las células tumorales TC – 1.

Figura 7.13 Análisis de la endocitosis de los nanovectores por TEM.

Figura 7.14 Evaluación del peso general y del peso tumoral de los murinos.

Figura 7.15 Evaluación morfológica de los tumores del grupo PBS en el modelo *in vivo*.

Figura 7.16 Evaluación morfológica de los tumores del grupo cCNTs del modelo *in vivo*.

Figura 7.17 Evaluación morfológica de los tumores del grupo oxCNTs – HA del modelo *in vivo*.

Figura 7.18 Evaluación morfológica de los tumores del grupo oxCNTs – HA – CPt del modelo *in vivo*.

Figura 7.19 Evaluación morfológica de los tumores del grupo CPt del modelo *in vivo*.

Figura 7.20 Evaluación morfológica del hígado en el modelo *in vivo*.

Figura 7.21 Evaluación morfológica de los pulmones del modelo *in vivo*.

Figura 7.22 Evaluación morfológica de los riñones en el modelo *in vivo*.

Figura 7.23 Evaluación morfológica del corazón, cerebro y bazo del grupo oxCNTs – HA – CPt en el modelo *in vivo*.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

(Por orden de aparición)

FDA: Federal Drug Administration. (Agencia federal de administración de fármacos y alimentos de EE. UU.)

CNTs: Nanotubos de Carbono.

SWCNTs: Nanotubos de Carbono de pared sencilla.

MWCNTs: Nanotubos de Carbono de pared múltiple.

nm: nanómetros.

μm: micrómetros.

DVQ: Deposición de Vapor Químico.

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

PEG: Politetilenglicol.

FRα: Receptor de Ácido Fólico alfa.

CTR1: Receptor Transportador de Cobre I.

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico.

h: horas.

-COOH: Grupo Carboxilo.

cCNTs: Nanotubos de Carbono Comerciales.

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico.

HNO₃: Ácido Nítrico.

μl: Microlitros.

oxCNTs: Nanotubos de Carbono oxidados.

HA: Ácido Hialurónico.

oxCNTs – HA: Nanotubos de Carbono oxidados y funcionalizados con Ácido Hialurónico.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EDC – HCl: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida).

NHS: N – Hidroxisuccinimida.

mg: miligramos.

ml: mililitros.

PEI: Polietilenimina.

oxCNTs – PEI: Nanotubos de Carbono oxidados y funcionalizados con Polietilenimina.

Cpt: Carboplatino.

oxCNTs – HA – Cpt: Nanotubos de Carbono oxidados, funcionalizados con Ácido Hialurónico y cargados con Carboplatino.

TEM: Microscopia electrónica de Transmisión.

FTIR: Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.

TGA: Análisis Termogravimétrico.

ATR: Reflectancia Atenuada Total.

TA: Temperatura Ambiente.

DSC: Escaneo de Calorimetría Diferencial.

ATCC: American Type Culture Collection.

SFB: Suero Fetal Bovino.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

mM: Milimolar.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DHE: Sonda Dihidroetidio.

DE: Desviación estándar.

-OH: Grupo Hidroxilo.

C=O: Grupo Carbonilo.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL CÁNCER.

El **cáncer** es la segunda causa de muerte a nivel global, se contabiliza que una de cada seis muertes es debida a este mal, además, el 70% de las defunciones provienen de países subdesarrollados o con altos índices de pobreza.¹ En México, se reporta una incidencia estandarizada por edad de 142.7 por cada 100,000 habitantes, sin embargo, esta cifra puede estar subestimada por falta de adecuado diagnóstico y tratamiento.²

El cáncer se puede definir como una secuencia de alteraciones genómicas a un nivel crítico en las células, especialmente la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor, esto puede ser provocado por factores ambientales, laborales, habituales, microbiológicos y genéticos.³ Estas alteraciones, provocan un crecimiento y división acelerado y descontrolado de las células, por lo que originan un tumor o conjunto de células que aumenta de tamaño y se puede diseminar a través de la sangre o vasos linfáticos (metástasis), alterando el funcionamiento correcto de los órganos.⁴

En la actualidad se ha observado una tendencia ascendente en el número de pacientes diagnosticados y en las tasas de mortalidad,⁵ esto es debido principalmente a que la esperanza de vida y el número de personas también ha aumentado, mientras más vive una persona, es más susceptible a desarrollar cáncer.⁶ Por lo tanto, esta patología ha trascendido como un problema de salud pública de importancia clínica prioritaria a nivel mundial.

1.2 TRATAMIENTO DEL CÁNCER

El cáncer es una patología muy diversa en cuanto a su origen y etapa de desarrollo, y estos dos factores son los principales que son tomados en cuenta para encontrar un tratamiento que sea efectivo.

Históricamente, el primer método de tratamiento contra el cáncer fue la resección con **cirugía**,⁴ este procedimiento solo se aplica para remover los tumores sólidos y a veces puede resultar contraproducente, ya que al haber inmunosupresión, induce metástasis y permite la infiltración de células malignas a los tejidos circundantes durante la manipulación del tumor.⁷ En los últimos años, los procedimientos quirúrgicos han incrementado su efectividad porque se han desarrollado técnicas menos invasivas como la endoscopia, uso de nitrógeno líquido (criocirugía) o el empleo de láser para eliminar el tejido con un mayor grado de precisión.⁸

Otro tipo de tratamiento para cáncer es la **radioterapia**, a principios del siglo XX, los médicos se percataron que la radiación producía cáncer, aunque de manera contradictoria, también lo curaba.⁴ En la actualidad, la radioterapia se emplea como un adyuvante de la cirugía y es tan importante que se aplica en aproximadamente 50% de los pacientes con cáncer.⁹ La mayoría de los tratamientos con radioterapia se llevan a cabo por la técnica de rayo externo, el cual utiliza fotones de alta energía que son dirigidos a los tejidos afectados de manera profunda, evitando así el daño por radiación en el tejido cutáneo.¹⁰ Aunque la tecnología ha logrado grandes avances con la finalidad de reducir los efectos secundarios de esta terapia, esta suele dejar secuelas a largo plazo, a nivel general como fatiga, debilidad muscular y dolor, así como a nivel localizado como cardiopatías, neuropatías o infertilidad.¹¹

Si bien, la cirugía y la radioterapia se erguían como los tratamientos más eficientes, solo un 33% de los pacientes lograban una buena supervivencia, por lo que se sospechaba de la existencia de micrometástasis que causaban recaída y deterioro en los pacientes.¹² Para

combatir este problema, se comenzaron a utilizar fármacos de naturaleza química por vía intravenosa en combinación con la cirugía y la radioterapia, elevando en gran cantidad el número de casos favorables, regresión del tumor e incrementando la supervivencia.¹³ A este método de tratamiento, utilizando fármacos sintéticos o derivados de productos naturales, se le conoce como quimioterapia.

La **quimioterapia** se empezó a utilizar a principios del siglo XX en modelos tumorales murinos, pero fue hasta el año de 1960 que se comenzó a observar un incremento en la eficacia terapéutica de la quimioterapia como tratamiento adyuvante de la cirugía o radioterapia.¹² Sin embargo, es bastante común observar complicaciones en los pacientes a causa de la quimioterapia, lo que complica diferenciar estos efectos de los padecimientos propios de la enfermedad.¹⁴

En la actualidad, existe un vasto repertorio de fármacos antineoplásicos que se pueden clasificar ampliamente en fármacos no específicos y específicos, en base a su acción contra ciertos tipos de cáncer, de los cuales se conocen las moléculas involucradas en su mecanismo.¹⁵ No obstante, la mayoría de los fármacos provocan reacciones adversas de distintas magnitudes, por ejemplo, los fármacos no específicos son altamente citotóxicos, suprimen la hematopoyesis, producen anemia y daños tisulares en vasos sanguíneos, pulmón e hígado.^{15,16} Mientras que, los fármacos específicos provocan reacciones menos severas, como erupciones en la piel.¹⁴

Para tratar de reducir los efectos adversos derivados de las quimioterapias, en los últimos años se han intentado diversas estrategias biotecnológicas para eficientizar la acción de los fármacos y que ésta sea dirigida mayoritariamente hacia las células tumorales, preservando los más posible el tejido sano, una de estas tecnologías es la nanomedicina.¹⁷

1.3 NANOMEDICINA

La **nanomedicina** es la rama de las nanotecnologías que se dedica a estudiar el uso de materiales nanométricos para el mejoramiento de la salud.¹⁸ Una de las partes importantes de la nanomedicina es la constante búsqueda de nanomateriales que permitan el uso de fármacos en dosis inferiores a las administradas de forma normal incrementando su eficacia.¹⁹

Existen grandes expectativas del uso de estos materiales para el tratamiento de patologías como el cáncer, enfermedades crónicas o infecciones resistentes,²⁰ inclusive, se ha observado cómo en los últimos años, el número de publicaciones y ensayos clínicos que relacionan el uso de nanopartículas con terapias contra el cáncer ha ido al alza dramáticamente.¹⁷ En estos ámbitos, la elaboración de sistemas transportadores inteligentes con nanomateriales, permite controlar la liberación de compuestos terapéuticos, ya sea por activación de un estímulo biológico interno o externo.^{21,22}

Recientemente, fármacos como antibióticos y antiinflamatorios ²³ o inclusive ligandos de anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico y material genético, se han probado en modelos animales con resultados prometedores.²⁴ Sin embargo, resulta complicado construir un nanomaterial que sea eficiente y seguro para su uso en humanos, por lo que es crucial su estudio detallado para el mejoramiento de sus características fisicoquímicas, así como su biocompatibilidad.²⁵

En la actualidad, existe una gran diversidad de nanopartículas que pueden ser aplicadas a la nanomedicina, inclusive, algunas como los liposomas, nanopartículas de albúmina o micelas poliméricas orgánicas ya están aprobadas por la agencia federal regulatoria de fármacos y alimentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) para su uso en pacientes con

cáncer.²⁶ Otros nanomateriales, relativamente nuevos, que en los últimos años han sido de gran interés en el ámbito farmacéutico por sus características fisicoquímicas, son los nanotubos de carbono.²⁷

1.4 NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs)

1.4.1 Generalidades de los CNTs.

Los CNTs son nanoestructuras cilíndricas descritas por primera vez en 1991.²⁸ Recientemente, los CNTs han adquirido un gran interés en el campo de los nanomateriales debido a su estructura y propiedades eléctricas, orgánicas, físicas y mecánicas.²⁹ Los CNTs son ampliamente usados en computadoras, estructuras de aviones, artículos deportivos y bicicletas.³⁰ Mientras que, en el campo de la biología y nanomedicina se han instalado como una herramienta prometedora para entrega de fármacos, vacunas, biosensores o andamiajes tisulares.³¹

Los CNTs son un alótropo del carbono, la estructura de estos puede ser descrita como una lámina enrollada de grafeno (anillos de benceno poliméricos). Se clasifican en dos grupos principales: CNTs de pared simple (SWCNTs) cuando se conforman por solo una hoja de grafeno o CNTs de pared múltiple (MWCNTs),³² cuando dos o más de una hojas de grafeno concéntricas están presentes. El diámetro de estos nanotubos puede ir desde 0.4 hasta los 2 nanómetros (nm) para los SWCNTs y entre 10 y 100 nm para los MWCNTs mientras que la longitud podría medir entre 10 y 50 micrómetros (μm) en ambos tipos.²⁸

En la actualidad, existen tres métodos para sintetizar CNTs: descarga de arco, deposición por vapor químico (DVQ) y ablación láser.³³ El método químico por deposición de vapor es el más utilizado en la síntesis de los CNTs, este proceso es muy robusto y las condiciones

pueden ser variadas para generar CNTs con diferentes características de tamaño, pureza y alineamiento.³² Este método utiliza hidrocarburos como metano o acetileno como fuente de carbono, mientras que el calor provee la energía necesaria para la formación de los CNTs, además, usa como catalizadores el cobalto, hierro o sílice dejando buenos rendimientos de producción, sin embargo, los CNTs no son suficientemente puros para su uso biológico.³³

1.4.2 Toxicidad biológica de los CNTs.

Debido al potencial que los CNTs poseen en el campo de la nanomedicina, numerosos estudios de modelos *in vitro* e *in vivo* se han dedicado a investigar la bioseguridad de los CNTs.

Hasta la fecha, estudios *in vitro* muestran que la principal vía de entrada a las células no fagocíticas es mediante endocitosis dependiente de clatrina, aunque también participan las vías dependientes de caveolina y la macropinocitosis.³¹ Se ha observado que la interacción entre los CNTs y las células produce inflamación aguda, apoptosis, formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) e inducción de muerte por autofagia.^{34,35}

En términos de **genotoxicidad**, es decir, el daño al ADN genómico, se ha reportado que los CNTs se internalizan en el citoplasma, generando disrupciones en el aparato mitótico, provocando desbalance cromosomal y daños genotóxicos que pueden generar neoplasias,^{3,31} sin embargo, la mayoría de estos estudios están efectuados *in vitro*, es decir, en cultivos celulares, por lo que es necesario evaluarlos en modelos animales para precisar la compatibilidad de los CNTs en un organismo.³

Uno de los principales problemas de los CNTs es la presencia de impurezas provenientes del proceso de síntesis, tales como residuos metálicos o partículas grafénicas, los cuales afectan

de manera importante la biocompatibilidad de estas nanoestructuras.²⁸ Por otra parte, tanto la longitud como el diámetro de los CNTs han sido relacionadas con su toxicidad; se ha observado que conforme más largos son los CNTs, representan un peligro mayor para el organismo.^{28,32}

Para tratar de reducir estos aspectos negativos de los CNTs, estudios actuales han encontrado que la remoción de estos residuos mediante tratamientos ácidos a alta temperatura disminuye su toxicidad, incrementa la biocompatibilidad y la adquisición celular.³⁵ Así mismo, se ha observado que este tratamiento ácido reduce el tamaño de los CNTs, reduciendo también su carcinogenicidad.³⁶

Por otra parte, la vía de administración de los CNTs ya sea intravenosa, aérea, oral o dérmica genera diferentes perfiles de toxicidad *in vivo*.³⁷ En roedores, se ha demostrado que por vía traqueal provocan inflamación crónica, formación de granulomas, fibrosis y efectos genotóxicos en el pulmón.^{34,38} En estudios *in vitro* se ha observado que produce propiedades tóxicas similares a las del asbesto u otras partículas fibrosas;³ además, en células de tumor de pulmón (A549) los MWCNTs mostraron una clara toxicidad que era dependiente del tamaño de los CNTs.³⁹ También, se ha observado que la inyección de los CNTs por vía intraperitoneal o intraescrotal produce mesotelioma en ratones transgénicos, pero no existe evidencia directa de que formen mesotelioma pleural o cáncer de pulmón.³¹

Por otra parte, se ha observado en modelos murinos que cuando los CNTs se administran por vía sistémica (intravenosa) primeramente se alojan en los pulmones, y después la acumulación ocurre en el hígado y bazo, además se ha visto que la excreción se lleva a cabo casi en su totalidad por las vías biliares y las heces, y una pequeña parte por la orina de manera intacta.^{32,39,40}

1.4.3 Funcionalización y Biocompatibilidad de los CNTs

La **biocompatibilidad** de un material es la capacidad que tiene de interactuar con sistemas biológicos sin causar daño, esta propiedad es óptima cuando se logra la ausencia de respuesta inflamatoria aguda, acumulación del material en el organismo, intoxicación por metabolitos y desarrollo de reacciones adversas como apoptosis o necrosis.²⁸

La naturaleza grafénica de los CNTs los hace químicamente insolubles en agua, lo que representa un serio problema para su aplicación en nanomedicina.³⁹ Para combatir este problema, se ha logrado modificar la estructura de la superficie del CNTs sometiéndolos a un proceso de oxidación, mediante ácidos fuertes (sulfúrico, clorhídrico), este proceso tiene como resultado la generación de grupos funcionales hidroxilo o carboxilo, los cuales posteriormente pueden ser usados para unir una gran variedad de moléculas.⁴¹

La **funcionalización** es el proceso de unir moléculas de naturaleza orgánica a cualquier tipo de nanopartícula.⁴² En nanomedicina, es un paso clave para incrementar la biocompatibilidad de las nanoestructuras, entre ellas los CNTs, incrementando la dispersabilidad en soluciones acuosas,²⁸ promoviendo la interacción con biomoléculas,³⁴ revirtiendo la naturaleza hidrofóbica de los CNTs con la cual formaría agregados tóxicos³² y haciéndolos aptos para acarrear fármacos y moléculas orgánicas como proteínas o ácidos nucleicos para expandir su uso en la nanomedicina.³³

Tanto los SWCNTs como los MWCNTs presentan propiedades para unir moléculas a su pared, sin embargo, estos últimos son capaces de funcionalizarse con mayor facilidad y sin comprometer la integridad de las paredes interiores,⁴³ logrado mantener las moléculas encapsuladas estables y protegidas.

Algunas de las moléculas más utilizadas para funcionalizar CNTs, son polímeros hidrofílicos, como el polietilenglicol (PEG) o el quitosán.^{44,45} El uso de estos polímeros incrementa sustancialmente la dispersabilidad en agua y biocompatibilidad de los CNTs, así como su vida media en torrente sanguíneo; mejora su metabolismo y excreción renal y biliar; evita la opsonización, y por ende la fagocitosis y la respuesta inflamatoria.⁴⁴ Cabe mencionar que la mayoría de estos estudios son de corto término, por lo que es esencial evaluar la respuesta inmune causada por la exposición crónica a los CNTs.

En un enfoque distinto, los CNTs se han funcionalizado con moléculas específicas que los acarrean hacia algún organelo en particular, como las mitocondrias, elevando así su retención celular, rendimiento y citotoxicidad del fármaco.³²

Por otra parte, una estrategia muy efectiva y usada en los sistemas de entrega de fármacos, y particularmente en los CNTs, es funcionalizar con moléculas ligando para que se unan con sus receptores, incrementando la **endocitosis mediada por receptores**, y por ende, aumentando la especificidad de la entrega.⁴⁶ En este sentido, los receptores de ácido fólico (FR α) o **de ácido hialurónico (CD44)**, los cuales están involucrados en activaciones de vías metabólicas y de proliferación celular, son frecuentemente encontrados en tumores de distinto origen y naturaleza.⁴⁷ Inclusive, existen diversos trabajos que han utilizado el **receptor CD44** para entregar fármacos antineoplásicos como doxorrubicina^{48,49} o gemcitabina⁵⁰ usando CNTs como sistema de entrega, los cuales han mostrado tener una buena selectividad y efectividad citotóxica contra células y tejido tumoral.

1.4.4 Los CNTs como herramienta para entrega de fármacos.

La nanotecnología provee nuevas fronteras en el estudio del combate del cáncer, los CNTs han recibido gran interés por su capacidad de funcionalización con un amplio repertorio de moléculas que los convierte en excelentes candidatos para su uso como sistemas de entrega de fármacos.³² La principal característica que poseen las nanoestructuras es su poder de penetración entre el tejido tumoral y de retención debido a su propiedad de evadir al sistema linfático tumoral, lo cual favorece el contacto del fármaco cargado en las nanoestructuras con las células tumorales.³²

Los CNTs poseen importantes ventajas con respecto a la entrega de fármacos sobre otros nanomateriales, son capaces de encapsular moléculas orgánicas o inorgánicas protegiéndolas de la degradación y disminuyendo su toxicidad.³⁹

Por sus propiedades fisicoquímicas, los CNTs presentan buena capacidad para el transporte de sustancias; en su interior hueco, fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos pueden ser cargados estableciendo enlaces covalentes y no covalentes.³² Además, se ha observado que fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas y el diámetro de los nanotubos son factores relevantes para la encapsulación de fármacos.²⁸

Físicamente, los CNTs, presentan un rango dinámico elevado (es decir, que son mucho más largos que anchos), lo que les provee de alta retención y permeabilidad en el tejido tumoral;⁵¹ además, su morfología parecida a aguja facilita la entrada transmembranal.³² También, la cavidad interna es eficaz para proteger compuestos lábiles de la oxidación, cambios de pH y degradación por parte de enzimas biológicas,²⁸ inclusive tiene mayor poder protector que otros nanomateriales como los liposomas, nanopartículas y dendrimeros.³³

Dependiendo de su tamaño, los CNTs pueden entrar a las células por dos vías: difusión (CNTs pequeños) y por fagocitosis o endocitosis (CNTs grandes).³⁹ Se ha visto que CNTs por encima de 400 nm de longitud son internalizados mediante endocitosis, mientras que aquellos por debajo de este número lo hacen por difusión,²⁸ dicha endocitosis puede ser mediada por receptores cuando a los CNTs se le insertan moléculas específicas que sean reconocidas por ligandos ubicados en la membrana celular.⁵²

Existe una serie de estudios de investigación básica considerable sobre los CNTs. Sin embargo, no ha sido posible trasladar los CNTs a una aplicación en humanos debido a las diferencias en los datos de seguridad, funcionalidad y eficiencia que arrojan dichos estudios,³³ causadas principalmente por la variabilidad de los procesos de síntesis y preparación de los componentes del nanosistema. Por lo tanto, es necesario conocer mejor la eficiencia en la carga de moléculas así como su sitio y los mecanismos de liberación de éstas.⁵³ En este estudio, evaluamos la seguridad y eficiencia que presenta un sistema de entrega de fármacos basado en CNTs *in vitro* e *in vivo* para ampliar el conocimiento.

1.5 FÁRMACOS PLATINADOS

1.5.1 Generalidades de los fármacos platinados

En la década de los 60's del siglo anterior, Röserberg descubrió la actividad antitumoral del **cisplatino** en modelos de sarcoma en ratas.⁵⁴ Dicho suceso fue un parteaguas para la oncología y estableció al cisplatino como el primer fármaco de esta naturaleza aprobado como antineoplásico por la FDA.⁵⁵ Este compuesto es eficiente para tratar diversos tipos de cáncer como el de cérvix, ovario, testículo, vejiga, colorrectal, pulmón, cabeza y cuello.⁵⁴⁻⁵⁶

El cisplatino, así como sus fármacos análogos, como el **carboplatino** y el **oxaliplatino**, liberan platino II (Pt II), esta especie forma enlaces intra e intercatenarios en el ADN de las células,⁵⁷ causando alteraciones en los procesos de transcripción y activando las vías de apoptosis.⁵⁸

Un aspecto importante en la quimioterapia basada en fármacos platinados es la resistencia o inactivación del efecto del platino en las células tumorales.⁵⁵ Se ha observado que la presencia de proteínas nucleófilas, bombas de flujo en la membrana y la subexpresión del transportador de cobre en la membrana (CTR1) están estrechamente relacionados con este tipo de resistencia.⁵⁸

1.5.2 Toxicidad de los fármacos platinados

El uso del cisplatino y de sus análogos platinados, requiere medicación paliativa debido a que provoca una serie de efectos adversos como nefrotoxicidad, neutropenia, neurotoxicidad, ototoxicidad, alopecia, náusea, vómito, entre otros.^{55,59}

El perfil tóxico y la resistencia adquirida han causado gran preocupación en la práctica clínica, por lo que se han desarrollado variantes estructurales del fármaco por ejemplo el carboplatino o el oxaliplatino,^{54,55,60} y aunque estas opciones presentan perfiles tóxicos más leves, siguen sin ser inertes para el organismo.^{55,61}

Por otra parte, también se ha observado que las terapias combinadas de fármacos platinados con agentes antineoplásicos nuevos (tercera generación) incrementan el nivel de éxito del tratamiento.⁵⁹ Sin embargo, la toxicidad no se reduce, debido a su baja especificidad hacia el tejido tumoral, lo que limita el uso de dosis elevadas.¹⁸

Recientemente, otra opción terapéutica que ha tomado importancia por su potencial aplicación en el diagnóstico, imagen y tratamiento del cáncer, es la nanomedicina.^{43,62} Estudios recientes han mostrado que los nanomateriales son capaces de entregar fármacos con pobre solubilidad y estabilidad como los fármacos platinados;⁴³ además, reducen su toxicidad y mejoran su farmacocinética, así como su biodisponibilidad para mejorar su efecto.^{43,58}

Los fármacos basados en platino suelen tener alta toxicidad, baja solubilidad y estabilidad reducida, lo que los hace candidatos ideales para usar la nanotecnología con el fin de optimizar su administración. Modelos moleculares computacionales han probado el potencial que presentan estos nanomateriales para encapsular drogas platinadas⁶³ y su eficacia para liberarlas en las células.⁶⁴ Estudios preclínicos con modelos *in vitro* o *in vivo* muestran que fármacos como el cisplatino,⁶⁵ carboplatino⁶⁶ u oxaliplatino,⁶⁷ así como profármacos basados en platino,⁵⁷ han sido encapsulados y liberados satisfactoriamente.

1.6 USO DE CNTs COMO SISTEMA DE ENTREGA DE FÁRMACOS PLATINADOS.

1.6.1 Características morfológicas de los CNTs para su uso en sistemas de entrega de fármacos platinados.

Cómo ya se ha mencionado, el diámetro de los CNTs depende directamente de la cantidad de capas de grafeno que formen su pared, y puede ir desde los 3 hasta los 100 nm, mientras que la longitud puede llegar hasta 20 o 30 μm , aunque puede modificarse mediante tratamientos químicos.⁶⁸

Los SWCNTs fueron los primeros en ser probados *in vivo* para acarrear cisplatino a un tumor sólido, mostrando resultados prometedores.⁴⁵ Sin embargo, los MWCNTs son una mejor opción ya que presentan un diámetro más ancho en comparación contra los de pared simple o doble, lo que les permite acarrear mayor cantidad de fármaco.^{43,69} Se ha observado que en CNTs de diámetros mayores, el platino se encapsula en mayor cantidad, se disminuye la posibilidad de escape del interior,⁵⁷ y se reduce el tiempo de encapsulación.⁶⁵

Algunos autores han investigado la repercusión de la longitud de los CNTs sobre su toxicidad basándose en la conocida patogenicidad causada por las fibras de asbesto, compuesto químicamente similar a los CNTs.⁷⁰ La toxicidad de los CNTs se logró reducir su longitud mediante tratamientos químicos para formar CNTs cortos, observando mayor grado de inocuidad; y al ser acoplados a cisplatino, se obtuvieron buenas tasas de toxicidad *in vitro* e *in vivo* contra cáncer de mama,^{51,71} Además, debido a las propiedades térmicas de los CNTs, ha sido posible activar la liberación del cisplatino mediante el uso de radiofrecuencia localizada para calentar el material.⁷²

1.6.2 Funcionalización en los CNTs para entrega de fármacos platinados.

Como se ha mencionado antes, la funcionalización es un proceso importante para optimizar la solubilidad en medios acuosos e incrementar la especificidad de los CNTs cuando se aplican en modelos biológicos. Existen estudios que se han desarrollado para evaluar las ventajas de utilizar CNTs para entregar fármacos platinados en modelos de cáncer tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se ha documentado que la funcionalización con moléculas poliméricas hidrofílicas como el PEG, pueden optimizar los CNTs de dos formas. Por una parte, incrementa su solubilidad en

los medios de cultivo y en medios acuosos para administrarlo, y por otro lado, evita su captura por parte del sistema fagocítico mononuclear del bazo y el hígado, incrementando la toxicidad del oxaliplatino⁷³ y del cisplatino⁴⁴ contra células tumorales.

También se ha visto que al utilizar moléculas como la rodamina – 123 (cargada positivamente) adosadas a los CNTs se necesita una concentración significativamente más baja de platino para afectar células tumorales de ovario (A2780).⁶⁹ Por otra parte, el acoplamiento de moléculas ligando como el Factor de crecimiento epidérmico (EGF)⁴⁵ y el ácido fólico,⁷⁴ ha demostrado ser eficiente en modelos *in vivo* para la entrega de fármacos platinados, de forma que la endocitosis mediada por receptores de estos sistemas eleva la tasa de captación de los CNTs específicamente en el tejido tumoral. Hasta la fecha, no se ha investigado la eficacia de la entrega de fármacos platinados usando ácido hialurónico como molécula específica, lo cual evaluamos en este estudio.

1.6.3 Carga del fármaco en los CNTs y tipos de fármacos platinados usados

Los primeros abordajes que se realizaron en cuánto a fármacos platinados en CNTs fueron uniendo las drogas a la pared superficial de éstos mediante enlaces covalentes en CNTs previamente funcionalizados.⁷⁵ Sin embargo, reportes posteriores demostraron que los fármacos platinados encapsulados en los CNTs son más eficientes, debido a que se previene la degradación prematura y se logra un efecto de liberación prolongada,⁵⁸ descargando aproximadamente el 60% del fármaco en los primeros 14 días de incubación en el medio de cultivo.⁴³

Mediante microscopia electrónica se ha logrado determinar la cantidad de átomos de platino que se encuentran encapsulados por unidad de medida de longitud del CNTs, esta cantidad

se encuentra claramente relacionada con las propiedades fisicoquímicas, tiempos de encapsulación y concentración del fármaco.⁷⁶

Otro abordaje novedoso para hacer más lenta la liberación rápida del fármaco platinado encapsulado es “tapar” los extremos de los CNTs por medio de nanopartículas inorgánicas, lo cual ha logrado incrementar la entrega intracelular de platino y optimizar su acción al evitar pérdidas hacia tejido inespecífico.⁶⁵ En un estudio nanopartículas de oro acopladas a los extremos de los CNTs, disminuyeron la liberación precoz del fármaco hasta en un 40% e incrementaron la citotoxicidad en una línea de cáncer de colon.⁷⁷

En lo que respecta a los tipos de fármacos platinados usados en sistemas de entrega basados en CNTs, el cisplatino, al ser el primer fármaco platinado aprobado por la FDA para el tratamiento de tumores, también fue el primero en ser encapsulado en CNTs en 2005. Se obtuvieron resultados positivos al mostrar una liberación prolongada en una solución hidrofílica, y una citotoxicidad adecuada *in vitro* contra células tumorales,⁷⁸ demostrando el potencial de los CNTs tenían como sistemas de entrega. A partir de este hallazgo, una gran variedad de estudios han realizado pruebas con distintas configuraciones de sistemas basados en CNTs acoplados a cisplatino.^{51,65,79}

Recientemente, se han realizado estudios en modelos *in vivo* para determinar la biodistribución de los MWCNTs cargados con cisplatino administrados por vía intravenosa.⁸⁰ Se encontró que el órgano donde este sistema se aloja primeramente a corto plazo es el pulmón. Posteriormente, el conjugado se traslada hacia bazo e hígado, teniendo poca presencia en riñón, principal órgano afectado por este fármaco.

Moléculas análogas del cisplatino como el carboplatino también han sido cargadas a los CNTs funcionalizados mostrando resultados muy alentadores, generando altos niveles de toxicidad en distintas células tumorales.⁸¹⁻⁸³ Este efecto se presenta tanto en CNTs de longitud elevada (nanofibras de carbono), así como en MWCNTs, siendo más predominante en los primeros⁷⁹; y se ha determinado que la toxicidad producida induce mayormente apoptosis e inhibición de la proliferación.⁸⁴ Por otra parte, el oxaliplatino ha sido acoplado a MWCNTs envuelto en PEG y probado *in vitro* en células HT29 de adenocarcinoma de colon, mostrando una mayor citotoxicidad en un plazo de 48 a 96 horas (h), produciendo una buena cantidad de entrecruzamientos en el ADN.⁷³

Por último, otra estrategia muy novedosa, es la encapsulación de profármacos platinados de platino (IV) hidrofóbicos, los cuales al entrar en la célula, utilizan las moléculas reductoras locales que al reaccionar con ellos producen la forma activa del platino (II) que es capaz de unirse al ADN.^{57,75} Este abordaje tiene como ventaja la baja solubilidad que tendrá el profármaco en una solución acuosa, quedando dentro de los CNTs hasta que se internalice en la célula y reaccione con las enzimas reductoras, cambiando su estructura hacia una más hidrofílica lo que se traduce en la liberación de especies reactivas de platino. Algunos otros fármacos platinados atípicos diseñados *de novo* se han logrado conjugar con las paredes de CNTs de pared múltiple, teniendo buenos efectos citotóxicos que son potenciados al aplicar calor en las zonas tumorales, activando los nanomateriales e incrementando su liberación selectiva en esa zona.⁸⁵

Cómo se ha mencionado anteriormente en este texto, los fármacos basados en platino suelen tener altas toxicidades y baja solubilidad, además de una estabilidad reducida, lo que los hace candidatos ideales para usar la nanotecnología con el fin de optimizar su administración.

Modelos computacionales moleculares han probado el potencial que presentan estos nanomateriales para encapsular drogas platinadas⁶³ y su eficacia para liberarlos en las células.⁶⁴ Además, fármacos como el cisplatino,⁶⁵ carboplatino⁶⁶ u oxaliplatino⁶⁷ así como profármacos basados en platino⁵⁷ han sido encapsulados en CNTs y probados satisfactoriamente en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Si bien existe una serie de estudios de investigación básica considerable sobre los CNTs, aún no ha sido posible trasladarlos a una aplicación en humanos debido principalmente a las diferencias en los datos de seguridad, funcionalidad y eficiencia que residen en el uso de estas nanoestructuras.³³ Además, es necesario conocer mejor la eficiencia en la carga de moléculas, el sitio de carga y los mecanismos de liberación del fármaco.⁵³ Por lo que en este estudio abordamos una estrategia de entrega de carboplatino en un sistema de MWCNTs, funcionalizados con hialuronato, en un modelo murino de cáncer *in vitro* e *in vivo*. Los resultados obtenidos nos permitirán tener un mejor conocimiento de la seguridad y eficacia que presenta este sistema; y ayudará a entender mejor su efecto antitumoral, metabolismo y excreción.

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el cáncer es una enfermedad de alto impacto a nivel mundial. La quimioterapia contra el cáncer utiliza fármacos como el carboplatino, el cual presenta baja selectividad y pobre retención, lo que provoca efectos tóxicos importantes en los pacientes al requerir aplicación de dosis múltiples.

Los nanovectores basados en nanotubos de carbono presentan un gran potencial como sistema de entrega de fármacos, con la ventaja de poder dirigirlos hacia células tumorales e incrementar su tiempo de acción.

Hasta la fecha, no existe evidencia del uso de un sistema biodirigido de nanotubos de carbono modificados con hialuronato para la entrega de carboplatino, por lo que consideramos importante su desarrollo y aplicación en un modelo de cáncer murino para analizar su potencial uso terapéutico.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

La terapia con un nanovector grafénico modificado con hialuronato y cargado con carboplatino es eficiente y segura en un modelo murino de cáncer *in vitro e in vivo*.

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

4. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la terapia con un nanovector grafénico modificado con hialuronato y cargado con carboplatino es segura y eficaz en un modelo murino de cáncer *in vitro e in vivo*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener y caracterizar el nanovector grafénico funcionalizado con hialuronato y cargado con carboplatino (oxCNTs – HA – CPt).
2. Determinar si el nanovector oxCNTs – HA – CPt muestra un efecto antineoplásico *in vitro*.
3. Evaluar la selectividad del nanovector oxCNTs – HA – CPt *in vitro* en líneas celulares tumorales y células no tumorales.
4. Determinar el efecto antineoplásico del nanovector oxCNTs – HA – CPt y su bioseguridad en un modelo murino de cáncer.

MATERIAL Y MÉTODOS

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1. Equipos utilizados

- ✓ Ultrasonicador Transonic 420 Elma – LabLine®
- ✓ Placa de calentamiento con agitación magnética
- ✓ Centrifuga para tubos cónicos refrigerada
- ✓ Potenciómetro UltraBasic UB – 10, Denver Instruments®
- ✓ Horno estufa
- ✓ Microscopio Electrónico, Carl Zeiss® EM – 109.
- ✓ Espectrofotómetro Spectrum One FTIR (Perkin Elmer®, Shelton, CT, EE. UU.
- ✓ Analizador termogravimétrico SDT Q600 (TA Instruments®).
- ✓ Agitador tipo Vórtex, Daiggen Genie 2, A. Daiggen Corporation®
- ✓ Muse Cell Analyzer, Millipore Sigma®
- ✓ Microscopio de luz, Nikon Eclipse 50i.
- ✓ Microscopio de fluorescencia, Laica DM1000.

6.1.2. Reactivos y materiales de laboratorio utilizados

- ✓ Nanotubos de carbono de pared múltiple: MWNT – COOH (Graphitized), presentación de 5 gramos, 50 – 80 nm diámetro, 10 – 20 µm de longitud. Stock: #1245YJF, CAS: #99685-96-8, Lot: #1245-071510. Nanostructured & Amorphous Materials Inc.® (Houston, Texas, EE.UU.)
- ✓ Ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄), CTR Scientific®
- ✓ Ácido nítrico concentrado (HNO₃), CTR Scientific®
- ✓ Agua destilada
- ✓ Acetona grado reactivo, CTR Scientific®
- ✓ Di-metilsulfóxido grado reactivo, Sigma – Aldrich®
- ✓ Clorhidrato de N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etil carbodiimida, Sigma – Aldrich®
- ✓ N – hidroxisuccínimida, Sigma - Aldrich®
- ✓ Polietilenimina, Sigma – Aldrich®
- ✓ Ácido hialurónico, Sigma - Aldrich®
- ✓ Carboplatino, Sigma - Aldrich®
- ✓ Acetato de Etilo, Sigma – Aldrich®
- ✓ Alcohol Etilico, grado reactivo, CTR Scientific®
- ✓ Rejillas de Cobre para microscopía electrónica, G200 – Cu, 200 / pulgada cuadrada, Electron Microscopy Sciences®
- ✓ Medio para cultivo celular, RPMI 1640 1X, Gibco®
- ✓ Suero fetal bovino para cultivo celular, Corning®
- ✓ Medio para cultivo celular, Advanced DMEM 1X, Gibco®

- ✓ Anticuerpo anti-CD44, [F10 – 44 – 2] (PE/Cy7), Abcam®
- ✓ Tabletas para preparar Buffer de fosfatos salino (PBS) al 1X (pH: 7.4), Sigma - Aldrich®
- ✓ Tetraóxido de Osmio, Electron microscopy Sciences®
- ✓ Resina epóxica (Resin embed-812, EMS®. # Cat: 14120).
- ✓ Citrato de plomo, Ladd Research Industries Inc.®
- ✓ Acetato de uranilo, Ladd Research Industries Inc.®
- ✓ Nitrato de uranilo, Hoffmann – Penther & Bosworth®
- ✓ Azul de Toluidina, Electron Microscopy Sciences®
- ✓ MTT [bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio], Sigma - Aldrich®.
- ✓ 3 – Propanol (Isopropanol), CTR Scientific®
- ✓ Dihidroetidio, Life Technologies, Eugene®
- ✓ Azul tripano, Corning®
- ✓ Tripsina 1X, Corning
- ✓ Clorhidrato de Ketamina, Laboratorios Konig®
- ✓ Clorhidrato de Xilacina, Richmond Vet Pharma®
- ✓ Formaldehído, CTR Scientific
- ✓ Glutaraldehído 25%, Ted Pella Inc®

6.1.3 Especímenes de origen biológico.

- ✓ Línea celular TC-1, epitelio pulmonar de ratón transformado con proteínas E6 y E7 de HPV-16. (ATCC® CRL – 2785, Manassas, Virginia, EE. UU.)
- ✓ Línea celular NIH / 3T3, fibroblastos de ratón. (ATCC®, CRL – 1658, Manassas, Virginia, EE. UU.)
- ✓ Línea celular HeLa, epitelio escamoso de cuello uterino. (ATCC®, CCL – 2, Manassas, Virginia, EE. UU.)
- ✓ 25 animales de laboratorio, especie: *Mus musculus*, de 6 a 8 semanas de edad, hembras, provenientes del bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS).

6.2 MÉTODOS

6.2.1. Construcción de los nanovectores.

Los CNTs adquiridos comercialmente, se encuentran grafitizados, es decir, que fueron generados a altas temperaturas, para eliminar trazas metálicas; tienen una pureza del 99,9% (stock: # 1240YJF) y están ligeramente funcionalizados con grupos carboxilo (-COOH) lo

que representa menos del 0,26% en peso. El diámetro de los CNTs oscila entre 50 y 80 nm con un diámetro interno (hueco central) de 5 a 15 nm, mientras que la longitud va desde 10 hasta 20 μm .

Primero, los nanotubos de carbono de grado comercial (cCNTs) se oxidaron mediante un tratamiento con ácidos fuertes y calor para aumentar el número de grupos carboxilo (-COOH) en la superficie.⁸⁶ Para esto, 40 miligramos (mg) de cCNTs se añadieron a una solución de 16 mililitros (ml) de una proporción 3:1 de H_2SO_4 y HNO_3 respectivamente. Esta suspensión se llevó a sonicación a una frecuencia de 36 kHz durante 15 minutos y después se homogenizó mediante agitación magnética vigorosa durante 24 horas (h) a una temperatura de 90 grados Celsius ($^{\circ}\text{C}$). Posteriormente, los CNTs oxidados (oxCNTs) se separaron por centrifugación y se lavaron con agua destilada hasta llegar a un pH neutro. Finalmente, se resuspendieron con 4 ml de acetona para ser transferidos a un vial de vidrio y ser secados en un horno a 60°C .

Una vez deshidratados, los oxCNTs fueron funcionalizados con ácido hialurónico (HA) (oxCNTs-HA).⁴⁸ En resumen, se dispersaron 20 mg de los oxCNTs en 8 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) mediante sonicación durante 30 minutos. Posteriormente, se activaron con una solución de clorhidrato de N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etil carbodiimida (EDC – HCl) y N-hidroxisuccinimida (NHS) en DMSO (20 mg y 10 mg respectivamente en 0.8 ml), dejando reaccionar durante mínimo 3 h homogenizando con agitación magnética. Una vez pasado este tiempo, se agrega la solución de polietilenimina (PEI, 20 mg en 2 mL de DMSO) como acoplador, permitiendo reaccionar durante 48 h. Posteriormente, los oxCNTs – PEI se recuperaron por centrifugación, se lavan con agua destilada 3 veces y se resuspendieron en 4 ml de acetona para secar en un horno a 60°C . Posteriormente, se realizó

una solución de HA en DMSO (20 mg en 1,5 ml) y se activó con una solución de EDC-HCl en DMSO (20 mg en 0,8 ml) durante un período de 3 h. Después, la solución de HA activada se añadió gota a gota a la solución de oxCNTs – PEI; luego, esta reacción se homogeneizó durante 48 h para crear nanovectores oxCNTs – HA que fueron recuperados con acetona y se secaron en el horno a 60°C. Finalmente, el carboplatino (CPt) se incorporó en el espacio interior de los oxCNTs – HA a través del método de nanoextracción descrito anteriormente.⁶⁵ En resumen, se resuspendieron 5 mg de oxCNTs – HA en 5 ml de acetato de etilo y se agregaron 5 mg de CPt. Luego, la solución se dejó homogeneizar por agitación magnética durante 72 h. Enseguida, a los oxCNTs – HA - CPt se les hicieron 3 lavados con 5 ml cada uno de una mezcla de acetato de etilo: etanol: agua en una proporción 3:1:1 y se secaron en un horno a 60°C durante 48 h.

6.2.2. Caracterización de los CNTs mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopía infrarroja (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA) e índice de hidrofobicidad.

Las características morfológicas de los CNTs se analizaron mediante TEM con un microscopio Carl Zeiss EM-109 a 80 kV. Para la observación de los CNTs, éstos se internalizaron en células TC – 1 tratadas en cultivo celular con las distintas construcciones de los nanovectores, a una concentración de 10 µg/ml durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las células fueron cosechadas con tripsina 1X y fijadas con glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos (pH: 7.4) para su procesamiento por la técnica para microscopía electrónica. Se realizó una deshidratación de las células con gradiente ascendente de acetona y las células se embebieron en resina epóxica. Posteriormente se realizaron cortes en un ultramicrotomo a 70 nm de grosor, los cuales se depositaron en una rejilla de cobre y se llevó a cabo el

contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Por último, las rejillas fueron llevadas al microscopio, y las observaciones se realizaron a 20,000x.

Por otra parte, para demostrar la funcionalización química con HA en los CNTs, se usó espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Los espectros FTIR se registraron en un espectrofotómetro Spectrum One FTIR (PerkinElmer®, Shelton, CT, EE. UU.) usando el modo de reflectancia total atenuada (ATR) a temperatura ambiente (TA). Los cCNTs, oxCNTs y oxCNTs – HA se depositaron en su forma de sólido libre de humedad en una ventana de seleniuro de zinc (ZnSe) ubicada en un accesorio MIRacle ATR. Los CNTs se molieron previamente por exfoliación mecánica en el mortero de ágata sin el uso de solventes. Además, la cantidad de HA en oxCNTs se determinó mediante análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las curvas TGA y DSC se adquirieron usando un analizador termogravimétrico SDT Q600 (TA Instruments). Se calentaron aproximadamente 20 mg de muestra en polvo en una bandeja de aluminio abierta bajo un flujo de N₂ (99.999%) de 100 ml/min con una rampa de calentamiento de 10°C/min hasta 1000°C. Las curvas registradas mostraron pérdida de peso (mg).

El índice de hidrofobicidad nos indica el grado de solubilidad que un determinado compuesto presenta en los disolventes polares y no polares. Para esto, utilizamos un método previamente reportado.⁸⁷ En resumen, se realizaron soluciones de CNTs en un rango de concentraciones desde 10 hasta 100 µg/ml en 3 ml de agua destilada (H₂O_d) y se sonicaron durante 15 minutos, posteriormente, se tomó una alícuota para medir su absorbancia a 550 nm (A₀). Después, se añadieron 3 ml de 1-octanol a estas soluciones, luego se mezclaron mediante agitación con vórtex durante 15 segundos y se dejaron reposar durante 30 minutos a TA, después de este tiempo, se tomó una alícuota de la fase acuosa y se midió nuevamente su

absorbancia a 550 nm (A_1). Una vez obtenidas las lecturas, el índice de hidrofobicidad se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100\%$$

6.2.3. Cultivo celular.

En este estudio, utilizamos dos líneas celulares murinas: la línea celular tumoral TC-1 (epitelio pulmonar de ratón transformado con proteínas E6 y E7 de HPV-16) y la línea celular no tumoral NIH / 3T3 (fibroblastos de ratón), ambas se obtuvieron del ATCC (Manassas, VA, EE. UU.). Las células TC-1 se cultivaron usando medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB), mientras que en las NIH / 3T3 se usó el medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero de ternera recién nacido. Además, la línea celular HeLa (cáncer de cuello uterino humano) se utilizó como control positivo de la inmunofluorescencia para detectar CD44. Estas células fueron cultivadas con medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Todas las líneas celulares se mantuvieron en una incubadora a 37 ° C en una atmósfera con 5% de CO₂.

6.2.4. Análisis de la citotoxicidad *in vitro* mediante el ensayo de MTT y el ensayo de tinción nuclear por DAPI.

La función mitocondrial de la célula se puede evaluar en función de la actividad de las reductasas que se encuentran en este orgánulo y se relaciona directamente con la viabilidad celular. Para determinar dicha actividad, decidimos usar el ensayo de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio], el cual se reduce a formazán por la acción de dichas enzimas.⁶⁵ Se incubaron $7,5 \times 10^3$ células por pozo ($n = 7$) en una placa de 96 pozos y se dejaron adherir durante 24 h. Posteriormente, se agregaron CNTs y CPt a las células

durante 24 h. Después de este tiempo, se añadió MTT a cada pozo y se incubó durante 3.5 horas a 37 ° C, luego se eliminó el sobrenadante y se añadió el reactivo revelador de MTT (HCl 4 mM, 0.040% NP40 en isopropanol), la placa se agitó durante 15 minutos antes de la lectura de absorbancia a 590 nm. La lectura de absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas, que es una medida indirecta de la viabilidad celular.

Para realizar una correlación entre los ensayos de viabilidad por MTT con la cantidad de células adheridas (viables) a la placa posterior al tratamiento, se llevaron a cabo tinciones nucleares con la sonda fluorescente 4, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).⁸⁸ Para esto, se utilizaron las mismas condiciones de incubación celular en placas de 96 pozos, así como los tratamientos que en los ensayos de MTT. Posterior al tratamiento, se realizaron 2 lavados con 400 µL de PBS 1X, para después fijar las células utilizando una mezcla de metanol y acetona en una proporción 1:1 durante 20 minutos a 4°C. Después, se retiró el fijador y se lavó una vez más con 400 µL de PBS 1X, para incubar con el DAPI [100ng/ml] durante 10 minutos a TA en oscuridad. Por último, se retiró el exceso de DAPI y se seca la placa de 96 pozos, para poder ser observada en el microscopio de fluorescencia. Se tomaron fotografías para ser evaluadas mediante el software Image J[®] versión 1.51, midiendo el porcentaje de área cubierta por las células, para determinar la cantidad de éstas que se encontraban adheridas a la placa.

6.2.5. Análisis del estrés oxidativo en respuesta a los CNTs *in vitro*.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) generan alteraciones moleculares en el ADN y proteínas celulares, afectando el metabolismo y la regulación del crecimiento celular.⁸⁹ Las ERO se evaluaron utilizando una sonda de dihidroetidio (DHE), la cual es una molécula que

se oxida en presencia de ERO como el ion superóxido (O_2^-) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y genera fluorescencia. En este estudio, las ERO se midieron por citometría de flujo, según un método previamente establecido por nuestro grupo de investigación.⁹⁰ En resumen, 1×10^6 células se sembraron en placas de 60 mm y se dejaron 24 h para su adhesión a la placa. Posteriormente, las células se trataron con las distintas construcciones de los nanovectores y Cpt a una concentración de 30 μ g/ml durante 24 h y luego se les administró la sonda DHE (10 μ M) dejando reaccionar por 15 minutos. Como control negativo (estrés oxidativo basal), las células solo recibieron medio fresco suplementado cuando se administraron los tratamientos. Luego, las células fueron cosechadas, lavadas con PBS 1X y resuspendidas para ser medidas por citometría de flujo (Muse Cell Analyzer, Millipore Sigma). Este equipo detecta la fluorescencia emitida por las células tratadas, la cual es directamente proporcional a la cantidad de ERO en dichas células.

6.2.6. Análisis de la presencia del receptor del HA (CD44) en las líneas celulares tumorales (TC-1) y no tumorales (NIH/3T3) murinas mediante inmunofluorescencia.

Según distintos reportes, el receptor del HA (CD44) se expresa muy frecuentemente en tejidos tumorales de diversos tipos, por lo que su ligando, puede servir como molécula para dirigir nanopartículas hacia estos tumores.⁹¹ Por lo tanto, hemos analizado la presencia de dicho receptor en nuestras líneas celulares tumorales y no tumorales murinas. En este trabajo, realizamos un método de inmunofluorescencia directa, utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón específico contra el CD44. Este anticuerpo va dirigido contra la isoforma 10 del receptor de HA, que se expresa altamente en epitelios y carcinomas; está conjugado con ficoeritrina y el fluoróforo CY7, que presenta un pico de emisión máximo a 774 nm de longitud de onda, que puede ser detectada por el microscopio de fluorescencia en el

canal/filtro rojo. Para esto, utilizamos placas de 24 pozos, cubreobjetos esterilizados fueron depositados en el fondo de cada pozo, posteriormente se sembraron 5×10^4 células en cada pozo, permitiendo su adherencia durante 24 h. Después, las células fueron fijadas utilizando acetona durante 10 minutos a TA. Pasado este tiempo, se realizaron 2 lavados con 400 microlitros (μ l) de PBS 1X – Tritón X-100 0.1 % durante 5 minutos cada uno para después bloquear las proteínas con suero de caballo al 10% en PBS 1X – Tritón X-100 0.1% durante una h a TA. Posteriormente se retiró el bloqueador y a las células se les agregó el anticuerpo anti – CD44/Ficoeritrina – CY7 diluido en PBS 1X – Tritón X-100 0.1% - BSA 1% en una concentración de 1:100 y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario, para realizar dos lavados con PBS 1X – Tritón X-100 0.1% y se le agregaron 100 μ l de DAPI [0.1 μ g/ml] durante 30 minutos a TA para la contratinción nuclear. Por último, los cubreobjetos fueron retirados de los pozos de la placa para ser montados en un portaobjetos utilizando glicerol como medio de montaje. Las células fueron observadas en un microscopio de fluorescencia marca Leica DM1000, se tomaron microfotografías, que fueron analizadas mediante el software ImageJ versión 1.5. Aquellas células que presentan fluorescencia en el canal rojo se interpretan como positivas para la presencia del receptor CD44.

6.2.7 Evaluación de la selectividad de los CNTs en líneas celulares tumorales y no tumorales murinas mediante morfometrías con microscopía de luz y TEM.

Los CNTs ingresan a las células mediante fagocitosis, formando vesículas intracitoplasmáticas parecidas a fagolisosomas. Para analizar este fenómeno, es necesario embeber las células en resinas epóxicas para obtener cortes semi-finos y finos para observarlos mediante microscopia de luz y TEM respectivamente.

Para esto, incubamos 1×10^6 células en placas de 60 mm y se les permitió adherirse durante 24 h. Posteriormente, las células fueron tratadas con cCNTs, oxCNTs, oxCNTs – HA - CPT y CPT a $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ durante 24 h. Después de este tiempo, se cosecharon usando tripsina al 0.25%, se lavaron dos veces con PBS 1X (pH: 7.4) y se llevó a cabo la fijación con glutaraldehído al 2.5% amortiguado en cacodilato de sodio 0.01M (pH: 7.4) durante 24 h. Después se realizó la post-fijación con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 2% durante 12 h, se lavaron con buffer de cacodilatos 0.01M (pH: 7.4) y se incubaron Nitrato de uranilo al 1% en H_2O durante 30 minutos. Después las muestras se lavaron con buffer de cacodilatos, se deshidrataron con un gradiente de acetona y se embebieron en resina epóxica de dureza media (Resin embed-812, EMS. # Cat: 14120). Finalmente, se obtuvieron cortes semi-finos (150 micrómetros [μm] de espesor, contrastados con azul de toluidina al 1%) y finos (80 μm de grosor, contrastados con citrato de plomo al 0.4% y acetato de uranilo al 5% ambas soluciones en H_2O) por ultramicrotomía.

En los cortes semi-finos, se contaron las células con vesículas o endosomas que contenían CNTs, considerando un total de 300 células por corte ($n = 5$) para obtener el porcentaje de células positivas en cada tratamiento. Además, en los cortes finos, se observaron, describieron y contaron las vesículas con CNTs por célula.

6.2.8 Desarrollo del modelo murino de cáncer para los tratamientos con CNTs.

Para el desarrollo de este trabajo, se reprodujo un modelo de cáncer subcutáneo en ratones hembra de la cepa C57BL/6, este modelo ha sido ampliamente usado por nuestro grupo de trabajo por lo que ha sido modificado a nuestras condiciones en el laboratorio.⁹² Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Investigación de la Facultad de Medicina, UANL con número de registro HI17-00006.

En este modelo, se utilizaron 5 grupos formados por 5 animales por cada grupo, los ratones tenían de 6 a 8 semanas de edad, se mantuvieron en cautiverio con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y se les proporcionó agua y comida *ad libitum*.

Cada ratón se inoculó con 4×10^4 células TC – 1 en 100 μ l de PBS 1X de forma subcutánea en el flanco izquierdo (día 0). A partir de la inoculación, se dejaron desarrollar los tumores durante 14 días. Una vez cumplido este plazo, los ratones que desarrollaron tumor palpable y observable al ojo humano, se sometieron a los tratamientos descritos en la tabla VI – I.

Grupo	Tratamiento
Negativo – Vehículo	PBS 1X
Positivo	Carboplatino 80 mg/kg – PBS 1X
Nanotubos comerciales	cCNTs 80 mg/kg – PBS 1X
Nanotubos funcionalizados	oxCNTs – HA 80 mg/kg – PBS 1X
Nanotubos funcionalizados y cargados con carboplatino (Nanovector completo)	oxCNTs – HA – CPt 80 mg/kg – PBS 1X

Tabla VI – I. Esquemas de tratamiento administrados a los grupos de estudio del modelo murino de cáncer.

La administración de los tratamientos a los animales se realizó en tres aplicaciones (a los 14, 17 y 20 días después de la inoculación de las células tumorales). La dosis máxima permitida de CPt en solución es de 80 mg/kg,⁹³ por lo que se utilizó dicha dosis en el tratamiento convencional. Y en el caso de los nanovectores cargados con CPt, se utilizó esta misma

concentración, lo que representa una cantidad de CPt significativamente menor, pues la mayor parte del peso del nanovector se encuentra constituida por los CNTs *per se*.

A los animales se les realizó un seguimiento para determinar su estado de salud, revisando su peso y comportamiento. Los animales fueron eutanizados mediante dislocación cervical bajo sedación (previa anestesia con inyección intraperitoneal de Ketamina/Xilacina, en dosis de 100 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente) en el día 23 posterior a la inoculación de las células tumorales.

Una vez eutanizados los animales, fueron perfundidos por punción cardíaca con PBS 1X para limpiar la sangre del animal. Posteriormente se aplicó paraformaldehído al 4% también mediante perfusión. Enseguida se disecaron los órganos vitales como los pulmones, hígado, riñón, bazo, corazón y cerebro para su evaluación histopatológica y análisis posteriores.

6.2.9 Análisis histológico.

Los órganos extirpados de los animales tratados fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 48 h para ser procesados mediante la técnica histológica convencional. Posteriormente, se deshidrataron con un gradiente de alcohol etílico en ascenso desde 70% hasta 100% y después en xilol para ser incluidos en parafina y realizar cortes de 5 µm de grosor en el microtomo. Estos cortes se montaron en portaobjetos y se hidrataron para aplicar la tinción con hematoxilina y eosina (Anexo 1) para distinguir la morfología general y la presencia de los nanovectores en los tejidos se evaluó mediante análisis microscópico, utilizando un microscopio Nikon Eclipse 50i.

6.2.10 Análisis estadístico

Estadística Descriptiva

Las variables cuantitativas se resumieron mediante el cálculo de la media y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

Estadística Inferencial

Con la finalidad de estudiar posibles diferencias entre grupos de ciertas variables cuantitativas entre grupos, en primer lugar, se aplicó una prueba para determinar si la variable se ajusta a la distribución normal o no (Kolmogorov-Smirnov), todas las variables resultaron tener una distribución normal. Debido a esto, para evaluar las posibles diferencias inter-grupos se utilizó la prueba t de Student para comparaciones múltiples con la corrección de Holm-Sidak. Los cálculos se realizarán con el programa SPSS versión 17 y para todos los análisis se aplicaron los criterios de $\alpha \leq 0.05$, $1-\beta = 80\%$ y pruebas de dos colas.

RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FÍSICOQUÍMICA DE LOS NANOVECTORES.

7.1.1. Evaluación morfológica de los nanovectores mediante microscopía electrónica de transmisión.

En el desarrollo experimental de este trabajo, los CNTs sufrieron diversos cambios físicos y químicos a través de los procesos de oxidación, funcionalización y encapsulación del CPt. Con estos cambios, la morfología de los nanovectores, en términos de dispersión, estructura y apariencia también van sufriendo modificaciones, esto puede ser evidenciado mediante TEM.

Primeramente, se analizaron los cCNTs (Fig. 7.1A), estos nanotubos mostraron un bajo nivel de dispersión en el medio acuoso de las células, se encontraron muy unidos entre sí, evidenciando una fuerza de cohesión importante, además de que frecuentemente se observaron enrollamientos, esto principalmente debido a su hidrofobicidad. En cuestión de apariencia, los cCNTs mostraron espacios vacíos centrales de aspecto electrolúcido, con paredes delgadas electrodensas (Fig. 7.1B).

En cambio, los oxCNTs – HA – CPt (Fig. 7.1C), presentaron una buena dispersión en el medio acuoso de las células, encontrándose más separados unos de otros, mayor solubilidad en medio acuoso, y además frecuentemente se les observó en su forma recta, lo que se traduce en una buena interacción con el medio líquido en el que se encuentran inmersos. Además, los oxCNTs – HA – CPt presentaron espacios centrales con un puntilleo fino electrodenso, que corresponde al CPt, las paredes presentaron un mayor grosor en comparación con los cCNTs, y se observaron regiones electrodensas, evidenciando la funcionalización con HA

(Fig. 7.1D). Estos hallazgos, establecieron diferencias morfológicas importantes entre los nanotubos iniciales y los finales con respecto al proceso de síntesis del nanovector. Además, se comprobó que estos últimos, presentaron buena capacidad para interactuar con medios acuosos.

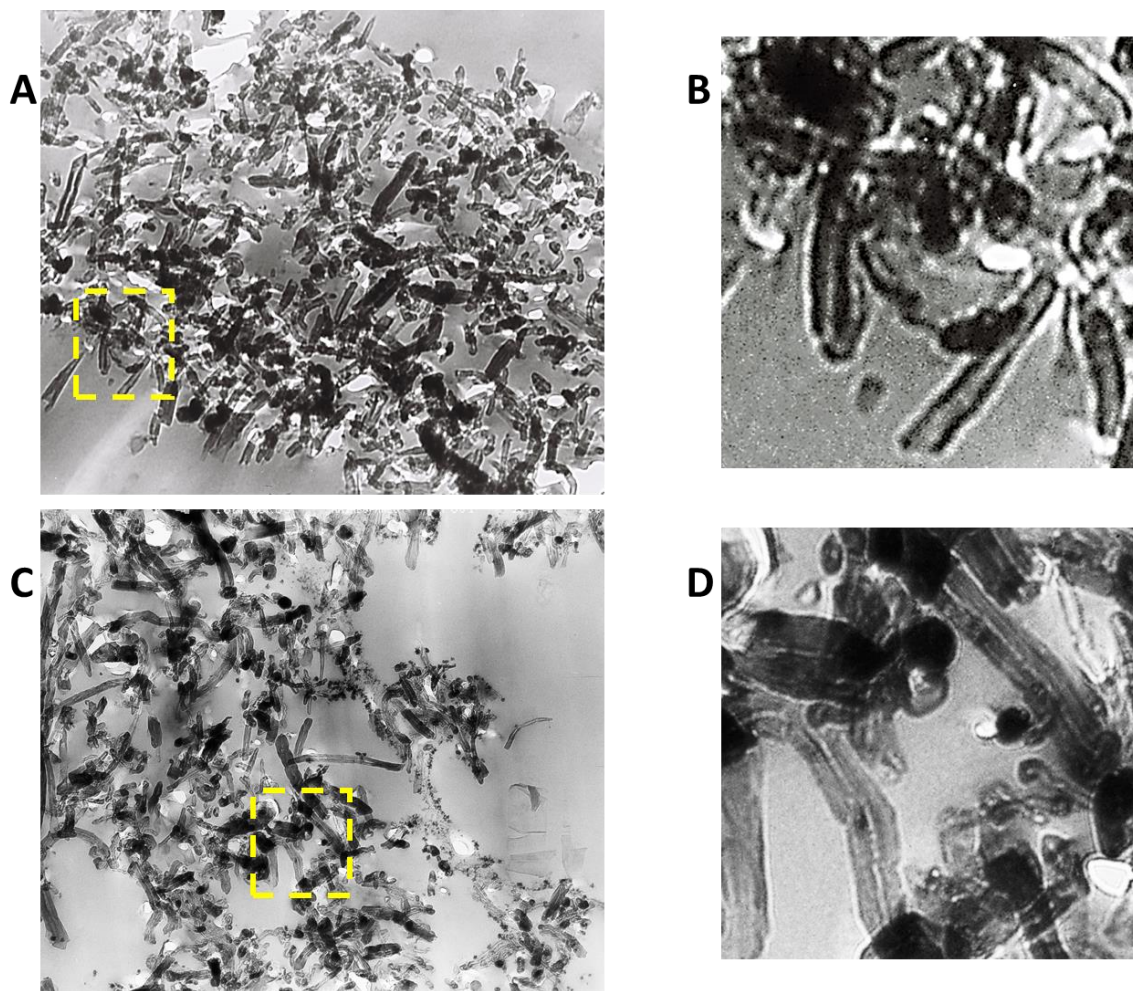


Figura 7.1. Caracterización ultraestructural de los nanovectores mediante TEM. A) cCNTs, 20000x B) cCNTs, 20000x (Amplificación digital del recuadro amarillo en A), C) oxCNTs – HA – CPt, 20000x, D) oxCNTs – HA – CPt, 20000x (Amplificación digital del recuadro amarillo en C).

7.1.2. Determinación de la composición química cualitativa de los nanovectores mediante espectroscopia infrarroja (FTIR).

Para comprobar la presencia de los componentes orgánicos en los CNTs, se llevaron a cabo distintas técnicas, una de ellas es la FTIR, la cual revela los enlaces químicos distintivos de la mayoría de los grupos funcionales, por ejemplo, carboxilo, carbonilo, hidroxilo, entre otros.

Los espectros de absorción infrarroja de los cCNTs, oxCNTs y oxCNTs – HA se muestran en la figura 7.2. Como se puede observar, los cCNTs solamente presentan las bandas de absorción características de su estructura grafénica, formada por los polímeros bencénicos que presentan dobles enlaces de carbono – carbono en forma resonante, estas bandas están ubicadas a 1584 y 1489 cm^{-1} (Fig. 7.2A).

Por otra parte, los oxCNTs, además de presentar estas bandas estructurales, exhibe una banda amplia a 3300 cm^{-1} que corresponde a la presencia del grupo hidroxilo (-OH) y otra banda prominente a 1800 cm^{-1} que pertenece al grupo carbonilo (C=O), estos dos grupos funcionales, son derivados del proceso oxidativo al que han sido sometidos estos oxCNTs, que deja como producto la carboxilación (-COOH) de las capas superficiales de los nanotubos (Fig. 7.2A).

Por último, los oxCNTs – HA presentaron un espectro de absorción muy similar al de los oxCNTs, con una diferencia muy particular, en este nanovector, el pico que aparecía a 1800 cm^{-1} , aparece a 1702 cm^{-1} (Fig. 7.2A) Este desplazamiento en la absorción se debe principalmente a que el grupo carbonilo (C=O) se encuentra ahora posicionado en un grupo amida secundaria (-CONHR) porque está formando el enlace del HA con la estructura

grafénica del nanotubo (Fig. 7.2B). Estas diferencias en los patrones obtenidos por espectroscopía infrarroja revelan la diferente naturaleza orgánica de los tres componentes sintetizados y caracterizados.

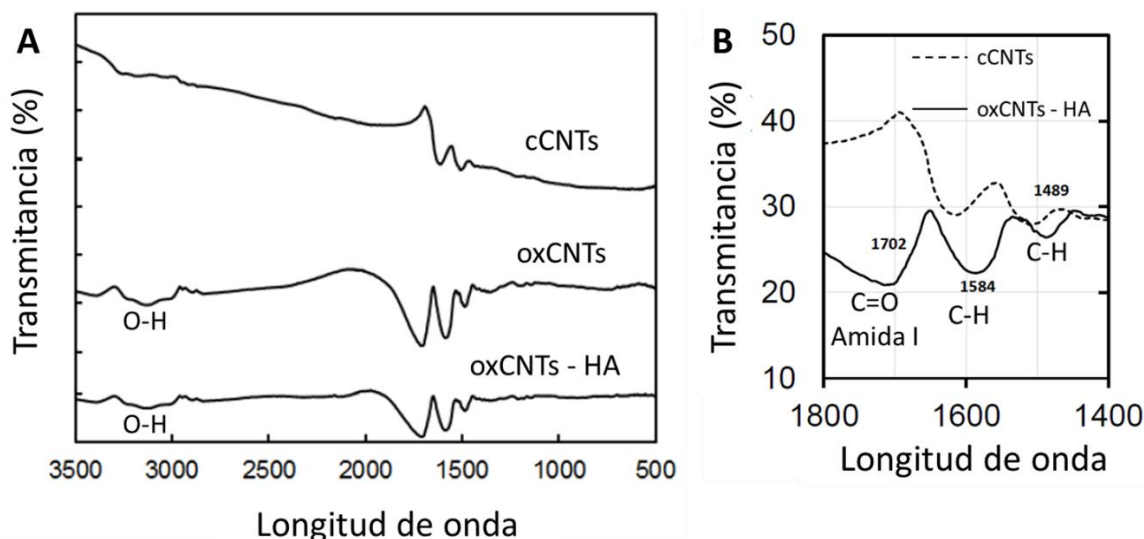


Figura 7.2. Caracterización de los nanovectores mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier. A) Espectro infrarrojo de los nanovectores conformados por los cCNTs, oxCNTs y oxCNTs – HA. B) Espectro infrarrojo restringido a 1800 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} de los cCNTs (línea continua) y los oxCNTs – HA (línea punteada).

7.1.3 Evaluación semi-cuantitativa de la composición orgánica de los nanovectores mediante termogravimetría.

Para conocer la cantidad aproximada de los componentes orgánicos de las distintas construcciones de los CNTs, llevamos a cabo la técnica termogravimétrica, que detecta los cambios en el peso del compuesto en función del incremento de temperatura. De esta forma, se revela la presencia de elementos orgánicos ya que estos suelen eliminarse por debajo de los 1000°C. Además, se realizó el escaneo de diferenciación calorimétrico, para determinar los patrones exotérmicos de la descomposición de cada una de las construcciones de los CNTs.

La primera construcción en analizarse fue la de los cCNTs, en la gráfica de descomposición térmica (Fig. 7.3A) podemos observar una leve pérdida de peso hasta que llega a los 400°C, donde se comienza a desintegrar la estructura grafénica de los CNTs. Después de esto, la descomposición tiene un ritmo lento pero sostenido, dejando en evidencia la poca cantidad de material orgánico.

Posteriormente, se realizaron los análisis en los oxCNTs, los cuales presentaron una disminución más evidente de su peso a medida que se iba incrementando la temperatura (Fig. 7.3B). Debido a la oxidación de las paredes, esta construcción presentó una pérdida de peso de alrededor de 3% mayor que los cCNTs, por lo que este porcentaje representa el nivel de grupos carboxilo unidos covalentemente a la estructura del nanotubo.

Por último, los oxCNTs – HA fueron evaluados, encontrando una disminución de peso bastante abrupta, sobre todo a partir de los 200°C hasta los 400°C, donde se pierde un 10% del compuesto inicial (Fig. 7.3C). Esta pérdida de peso evidentemente se debe a la presencia del HA en la construcción, cuya cantidad se calcula en aproximadamente un 6 o 7% del peso total. Tanto la descomposición térmica, como las curvas del escaneo diferencial calorimétrico, demostraron ser congruentes con el tipo de construcción teórico de los distintos CNTs. Además de que los patrones de reacciones exotérmicas son particulares para cada uno de los compuestos. Esta evidencia en conjunto demuestra que las tres construcciones analizadas poseen una naturaleza orgánica completamente diferente.

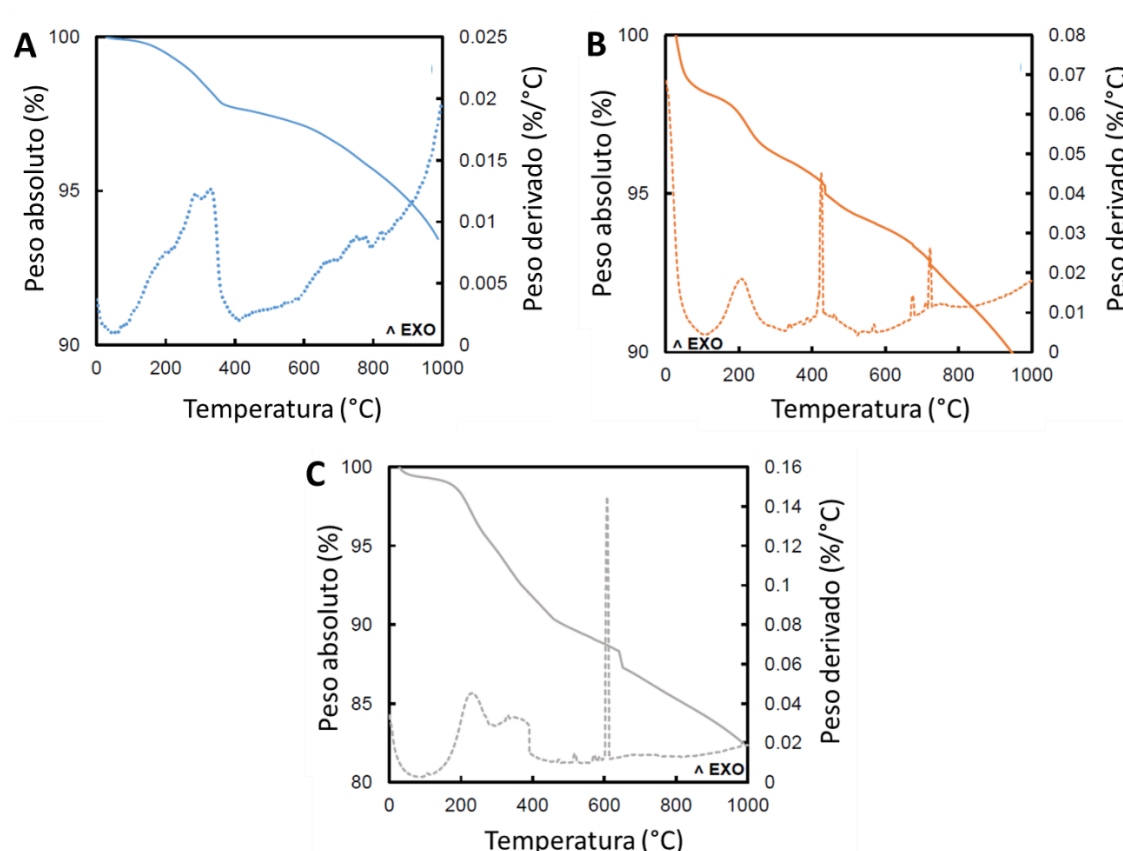


Figura 7.3 Curvas de descomposición térmica (Peso absoluto, línea continua) y de escaneo diferencial calorimétrico (Peso derivado, línea punteada) de los nanovectores. A) cCNTs, B) oxCNTs, C) oxCNTs – HA. ΔExo = Proceso exotérmico.

7.1.4 Análisis del índice de hidrofobicidad de los nanovectores mediante extracción líquido – líquido.

En este ensayo, evaluamos las propiedades hidrofóbicas de cada una de las construcciones de los CNTs basándonos en su afinidad a dos tipos de solventes de distinta polaridad, uno polar, que es el agua, y otro apolar, como el n – octanol. Mientras más hidrófoba sea la construcción, será más soluble en el solvente apolar.

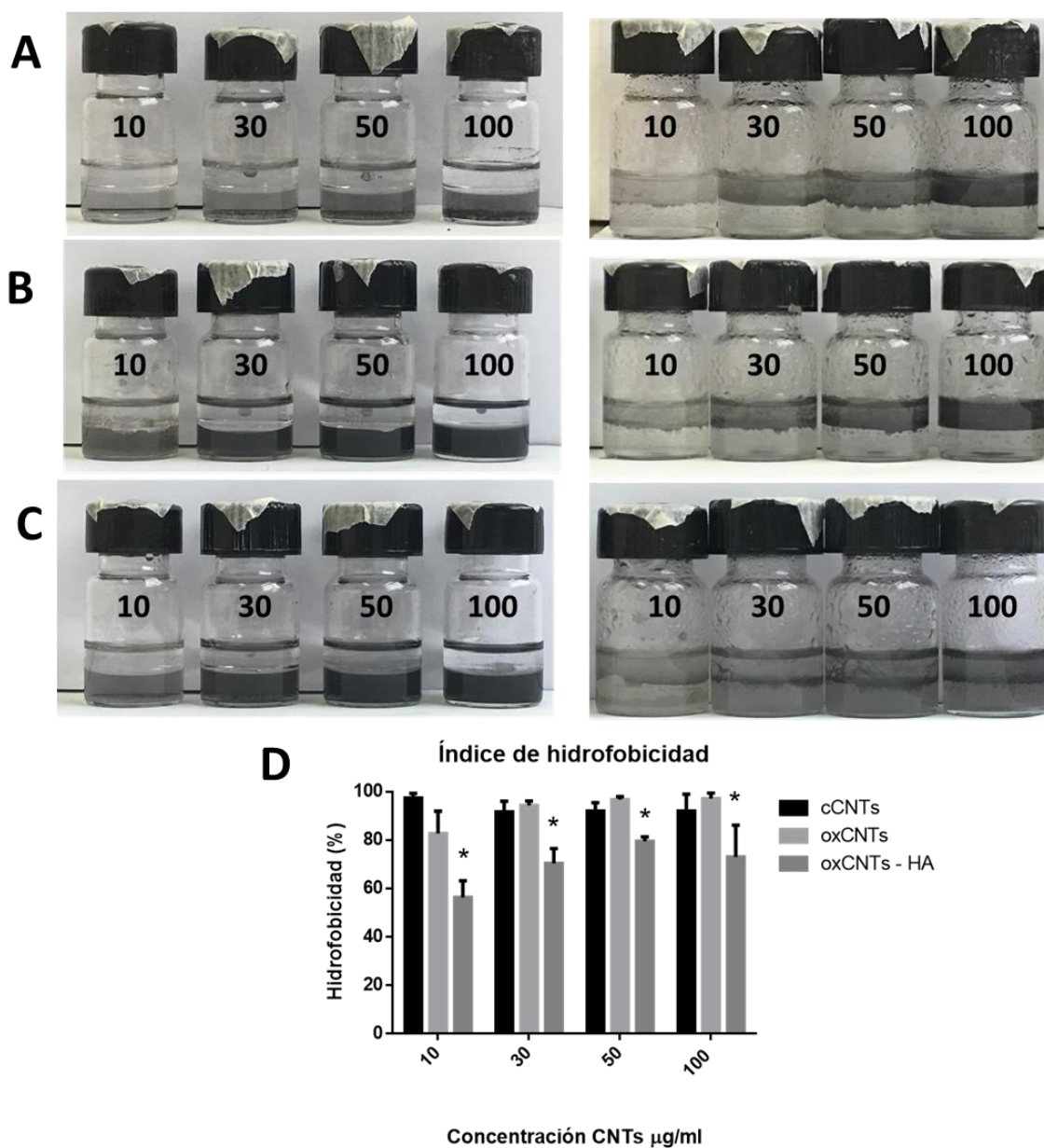


Figura 7.4. Índice de hidrofobicidad de los nanovectores. Se muestran antes (izquierda) y después (derecha) de la agitación. A) cCNTs, B) oxCNTs, C) oxCNTs – HA, D) Cuantificación del índice de hidrofobicidad. 10, 30, 50, 100 = concentración de los nanovectores en µg/ml. * = $p < 0.05$ vs cCNTs, T de Student, $n = 5$.

En la figura 7.4 podemos observar cómo las tres construcciones de CNTs resultaron tener distintas propiedades de hidrofobicidad después de los análisis. Primeramente, los cCNTs (Fig. 7. 4A) presentaron un índice de hidrofobicidad de cerca del 100%; todas las concentraciones de este tipo de CNTs preferentemente se ubicaron en el solvente apolar. De

manera similar, los oxCNTs (Fig. 7.4B) mostraron un comportamiento apolar, solamente en la concentración más baja (10 µg/ml) la hidrofobicidad disminuyó levemente (Fig. 7.4D). Por otra parte, los oxCNTs – HA (Fig. 7.4C) tuvieron un comportamiento más hidrofílico, estableciendo un coeficiente de partición evidente en todas las concentraciones analizadas, esto debido a la presencia del polímero hidrofílico de HA en el nanovector. En este último caso, el índice de hidrofobicidad se redujo a un 56% en la concentración más baja y a 73% en la más alta, valores más bajos estadísticamente significativos en comparación con los de los cCNTs (Fig. 7.4D).

Con las evidencias microscópicas, espectroscópicas, termogravimétricas y fisicoquímicas, se puede comprobar la correcta funcionalización y presencia del HA en los nanovectores desarrollados en este estudio.

7.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO *IN VITRO* DE LOS NANOVECTORES.

7.2.1 Análisis de la citotoxicidad de los nanovectores en las células tumorales y no tumorales mediante el ensayo de MTT.

La eficacia citotóxica es una de las características más importantes de un fármaco antineoplásico y el uso de sistemas de entrega de fármacos busca potenciar esta propiedad. Al ser los vehículos, los sistemas de entrega o nanovectores deben presentar poca o nula citotoxicidad, siendo el fármaco el responsable del efecto citotóxico. Para medir esto, utilizamos primero el ensayo de MTT, el cual se basa en la actividad de las reductasas mitocondriales, evaluando indirectamente la viabilidad en función de la actividad mitocondrial.

Para identificar si los nanovectores son seguros y eficaces, evaluamos las construcciones de los nanovectores en su etapa inicial y final, es decir, los cCNTs y los oxCNTs – HA – Cpt y se compararon contra el efecto citotóxico del Cpt tanto en las células tumorales como en las no tumorales.

Las primeras células en analizarse fueron las NIH – 3T3, que son una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón. En cultivo celular, estas células tienen propiedades adherentes, un tamaño de aproximadamente 18 μm , y forma ahusada, con proyecciones citoplasmáticas de dos polos; núcleos prominentes centrales, esféricos y rodeados por un citoplasma abundante (Fig. 7.5A).

Por otra parte, la línea celular murina tumoral analizada corresponde a las células TC – 1, las cuales provienen de epitelio pulmonar, y están transformadas con proteínas oncogénicas para desarrollar el fenotipo tumoral. Estas células también son adherentes en cultivo celular, son más pequeñas que las NIH/3T3, ya que solo miden 12 μm , las proyecciones citoplasmáticas suelen tener 2 polos y ser angostas; además, sus núcleos son más pequeños y están rodeados por poco citoplasma (Fig. 7.5B).

La viabilidad de las células adherentes se puede correlacionar con la propiedad de adherencia adoptando su morfología habitual; las células que pierden esta propiedad adquieren una forma esférica, se encuentran flotando en el medio de cultivo y se catalogan como células muertas. De esta forma, mientras más células se encuentren adheridas y presenten su morfología normal existirá una mayor viabilidad celular. En este sentido, podemos observar que cuando las células NIH/3T3 son tratadas con los cCNTs a altas concentraciones una menor proporción de células se adhiere a la placa de cultivo (Fig. 7.5B), en comparación con el control sin tratamiento. Este efecto ocurre de manera similar en el caso de las células TC

– 1 expuestas a cCNTs (Fig. 7.5D), en el caso de los oxCNTs – HA – CPt, se observó como las células TC – 1 sufrían una mayor pérdida de adherencia en comparación con las células NIH / 3T3.

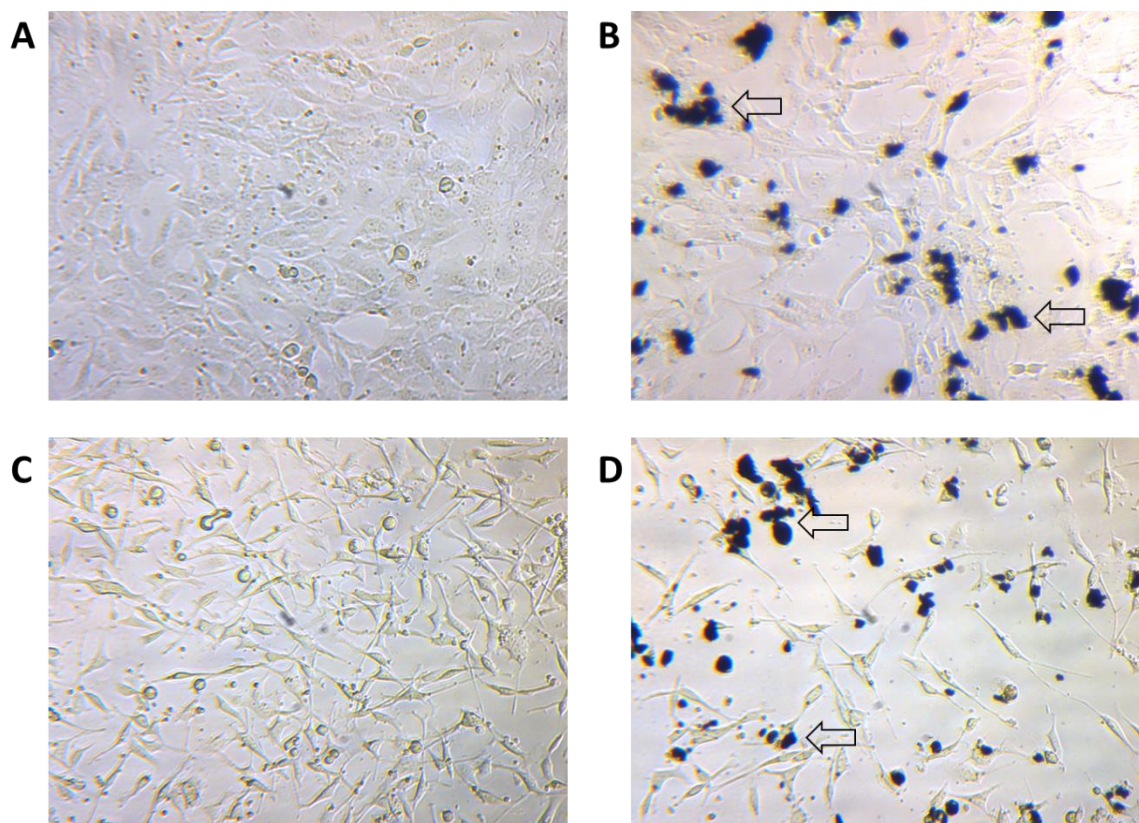


Figura 7.5. Micrografías representativas del efecto citotóxico causado por los CNTs en los cultivos celulares.

A) NIH / 3T3 sin tratamiento, 100X. B) NIH / 3T3 tratadas con 50 µg/ml de cCNTs (Flechas negras), 100X. C) TC – 1 sin tratamiento, 100X D) TC – 1 tratadas con 50 µg/ml de cCNTs (Flechas negras), 100X.

Los fibroblastos expuestos a los cCNTs tuvieron una viabilidad aproximada del 75%, independientemente de la concentración, mientras que; al ser tratados con CPt, se observó un efecto citotóxico leve que se incrementa conforme se aumenta la concentración. En cambio, cuando las células son tratadas con los oxCNTs – HA – CPt, la viabilidad se recupera a los niveles iniciales, confiriéndole seguridad a este tipo celular no tumoral ante la toxicidad causada por el carboplatino (Fig. 7.6A).

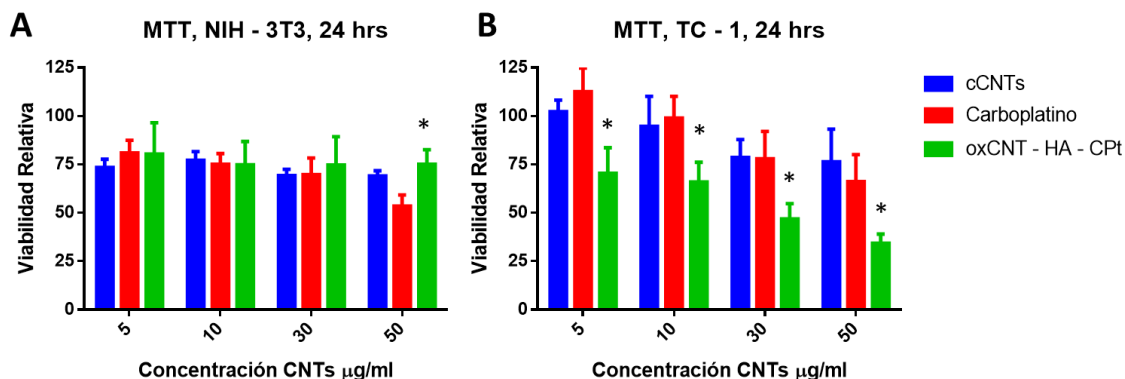


Figura 7.6 Reducción de la viabilidad de las células tumorales causada por el nanovector final. A) Citotoxicidad por MTT en células NIH / 3T3. B) Citotoxicidad por MTT en células TC – 1. * = $p < 0.05$ vs Cpt, T de Student, $n = 7$.

Por otro lado, las células tumorales, al ser expuestas a los cCNTs, mostraron una citotoxicidad muy leve, pero que iba en aumento al incrementar la dosis, disminuyendo la viabilidad aproximadamente a un 25% a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Asimismo, en respuesta al Cpt en estas células, se observó un efecto muy similar, solo que el incremento en la citotoxicidad es levemente menor disminuyendo la viabilidad a un 67% a 50 $\mu\text{g/ml}$. Por último, cuando fueron tratadas con el nanovector final, las células experimentaron una toxicidad significativamente mayor en respuesta a todas las concentraciones comparados con el efecto del Cpt, disminuyendo la viabilidad a un 35% con la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 7.6B).

Estos resultados, evidencian el incremento en la potencia citotóxica del Cpt en las células tumorales al ser cargado en un nanovector funcionalizado con HA. Además, este efecto tóxico no se ve reflejado en las células de naturaleza no tumoral, generando un efecto específico y seguro para un tratamiento antineoplásico.

7.2.2 Análisis del efecto citotóxico de los nanovectores mediante el ensayo del contraste nuclear con DAPI.

Debido a que los ensayos de MTT se basan en la actividad mitocondrial, decidimos realizar también, el análisis del contraste nuclear con tinción de DAPI para comparar y correlacionar los resultados obtenidos de viabilidad. El DAPI reacciona con el ADN de las células adheridas al plato de cultivo, que son aquellas que lograron mantener su viabilidad después de los tratamientos. En la figura 7.7, se puede observar que existe una evidente disminución tanto de la cantidad de células NIH / 3T3 (Fig. 7.7A, B) como de las TC – 1 (Fig. 7.7C, D) que fueron tratadas con los cCNTs en comparación con las no tratadas, lo que indica un aumento en la pérdida de la viabilidad. Esto sirve para correlacionar los resultados entre las técnicas de MTT y DAPI, dando más certeza al efecto citotóxico observado de los CNTs.

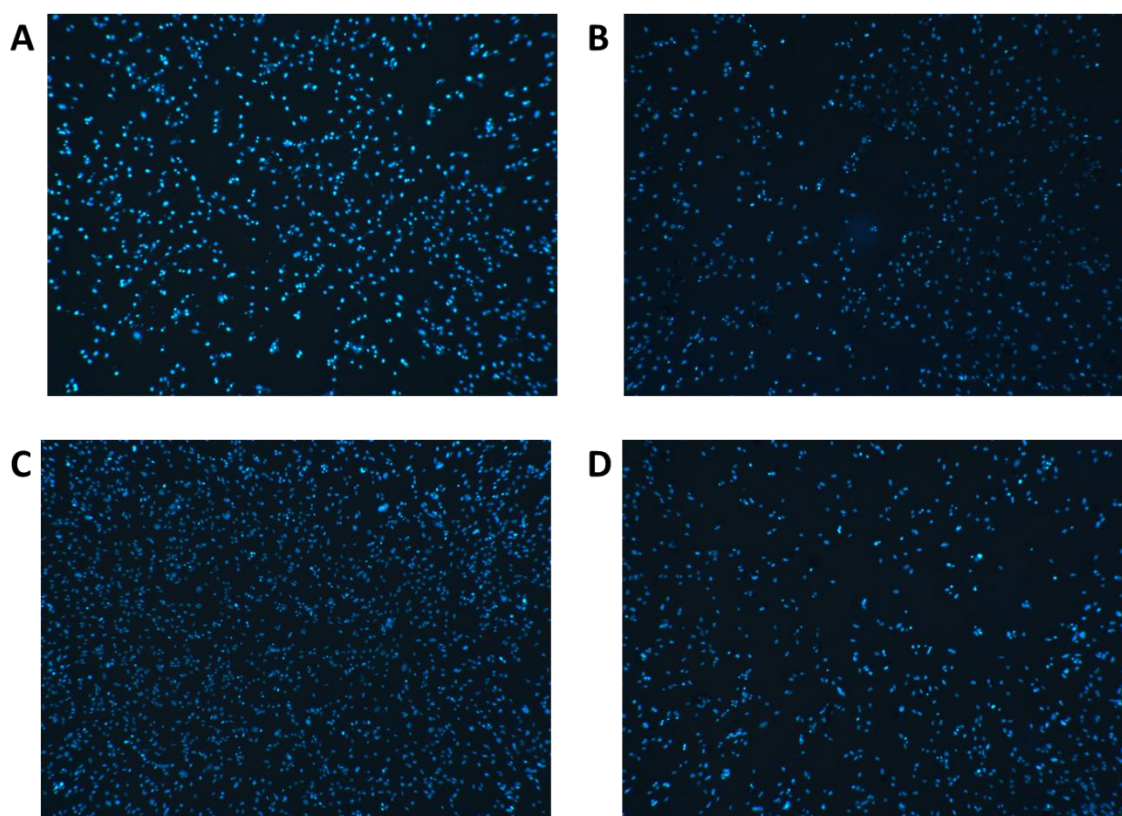


Figura 7.7. Micrografías representativas del efecto citotóxico de los nanovectores con la tinción nuclear de DAPI. A) Células NIH / 3T3 sin tratamiento, 100X. B) Células NIH / 3T3 tratadas con oxCNTs – HA - CPT a 30 µg/ml, 100X. C) Células TC - 1 sin tratamiento, 100X. D) Células TC – 1 tratadas con oxCNTs – HA – CPT a 30 µg/ml, 100X.

Primero, se analizaron las células NIH / 3T3 de naturaleza no tumoral (Fig. 7.8A). Dichas células, al ser tratadas con los cCNTs mostraron poca citotoxicidad, la cual se incrementó de manera dosis dependiente, disminuyendo a un 75% de su viabilidad a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. En el caso del CPT, a dosis bajas fue menos citotóxico que los cCNTs; sin embargo, a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, solamente se mantuvo una viabilidad del 45% aproximadamente. En cambio, al utilizar el nanovector cargado con CPT, esta toxicidad se redujo, dado que las células expuestas a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, presentaron una viabilidad del 58%, confiriéndole a las células no tumorales un efecto de protección ante la citotoxicidad causada por el CPT.

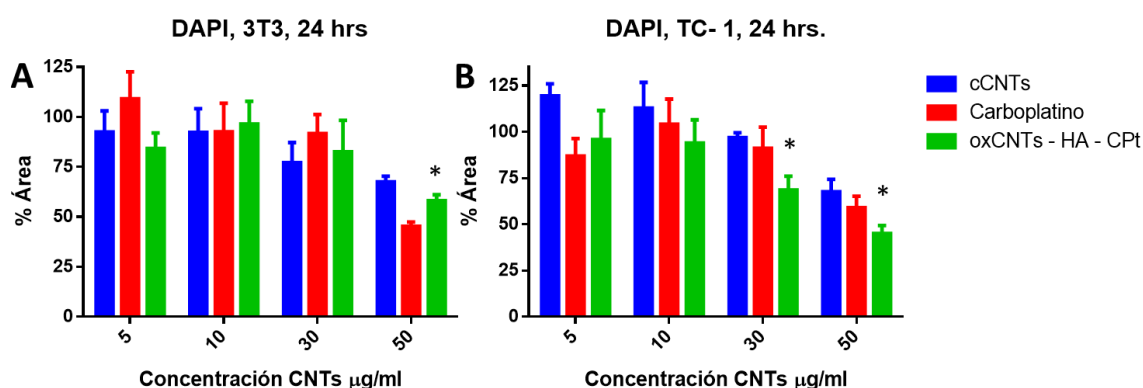


Figura 7.8. Reducción de la viabilidad celular en las células tumorales causado por los nanovectores mediante DAPI. A) Citotoxicidad en células NIH / 3T3. B) Citotoxicidad en células TC – 1. * = $p < 0.05$ vs CPT, T de Student, $n = 7$.

Por otra parte, las células TC – 1 de naturaleza tumoral (Fig. 7.8b), al ser tratadas con los cCNTs, mostraron un patrón de citotoxicidad muy leve, aunque con un efecto dosis dependiente, llegando a presentar una viabilidad del 67% a 50 $\mu\text{g/ml}$. Además, cuando estas células fueron tratadas con el CPT, también se presentó un efecto dosis dependiente, y si bien la viabilidad se redujo, no fue de manera sustancial, mostrando niveles del 91 y 60% a 30 y 50 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. En cambio, cuando las células tumorales fueron tratadas con el

nanovector final, este sistema potenció considerablemente la pérdida de viabilidad celular, llegando a un 68 y 45% a las mismas concentraciones de 30 y 50 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Estos resultados evidencian la especificidad citotóxica que presenta nuestro sistema y brinda la oportunidad de utilizarlo a una dosis menor para reducir el daño a las células no tumorales.

7.2.3 Análisis del estrés oxidativo en respuesta a los nanovectores.

Las ERO suelen causar alteraciones en el metabolismo celular a nivel de diversas moléculas como lípidos, proteínas o ADN. Para medir el estado oxidativo de las células al ser expuestas a los distintos nanovectores, utilizamos la sonda DHE, la cual captura las ERO y al hacerlo, se oxida, generando fluorescencia en las células, la cual puede ser detectada por un citómetro de flujo.

Para estos análisis, se seleccionó la concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ que demostró disminuir la viabilidad de las células tumorales y no afectar a las células no tumorales, y se evaluó el estrés oxidativo en respuesta a las distintas construcciones del nanovector.

Los niveles de estrés oxidativo de las células tumorales fueron significativamente más elevados que los de las células no tumorales (Fig. 7.9). De manera interesante, cuando las células fueron tratadas con los cCNTs, se pudo observar una disminución significativa en los niveles de estrés oxidativo en los dos tipos celulares. Sin embargo, esto no se produjo cuando las células fueron expuestas a los nanovectores finales, en donde solo se mostró una leve tendencia al alza en el estrés oxidativo de las células tumorales que no fue significativo. Esta evidencia prueba que la inducción de estrés oxidativo no tiene un papel importante en la

citotoxicidad causada por el nanovector final o inclusive con el fármaco administrado de forma convencional.

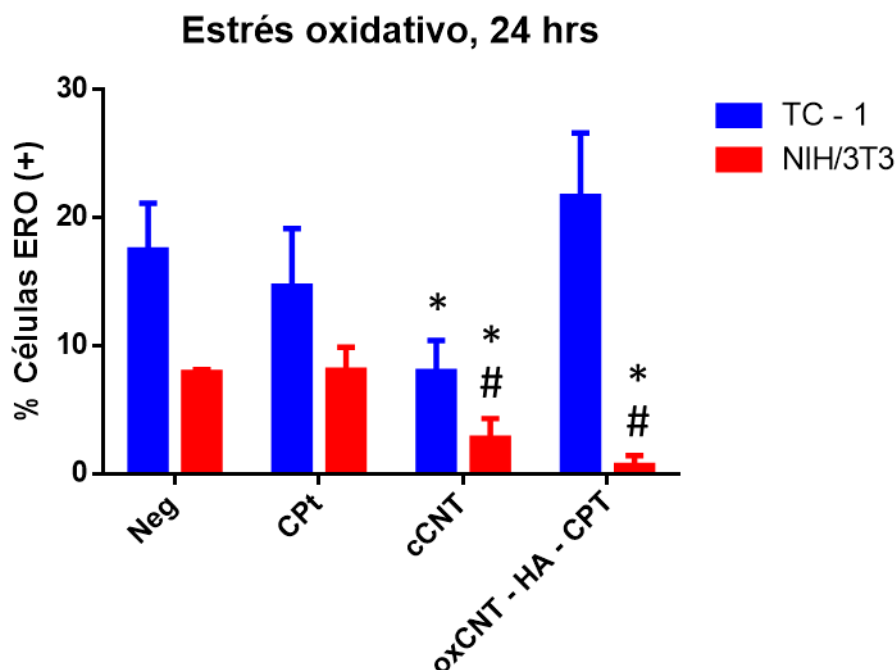


Figura 7.9 Cuantificación del estrés oxidativo en respuesta a los nanovectores en las células NIH / 3T3 y TC – 1. Neg = No tratadas, * = $p < 0.05$ vs Neg, # = $p < 0.05$ entre tipos celulares con el mismo tratamiento., T de Student, $n = 3$.

7.3 EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD ESPECÍFICA DE LOS NANOVECTORES *IN VITRO*.

7.3.1 Análisis de la presencia del receptor de ácido hialurónico (CD44) en las líneas celulares tumoral y no tumoral mediante la técnica de inmunofluorescencia.

Cómo antes se ha mencionado, las células tumorales suelen sobreexpresar receptores de ciertas moléculas como el HA o el ácido fólico para incrementar su metabolismo y capacidad de proliferación celular. Es por esto, que una de las nuevas estrategias para la entrega de fármacos antineoplásicos es utilizar moléculas ligando para estos receptores. Para demostrar

la presencia del receptor de HA en nuestras líneas celulares, decidimos utilizar la técnica de inmunofluorescencia.

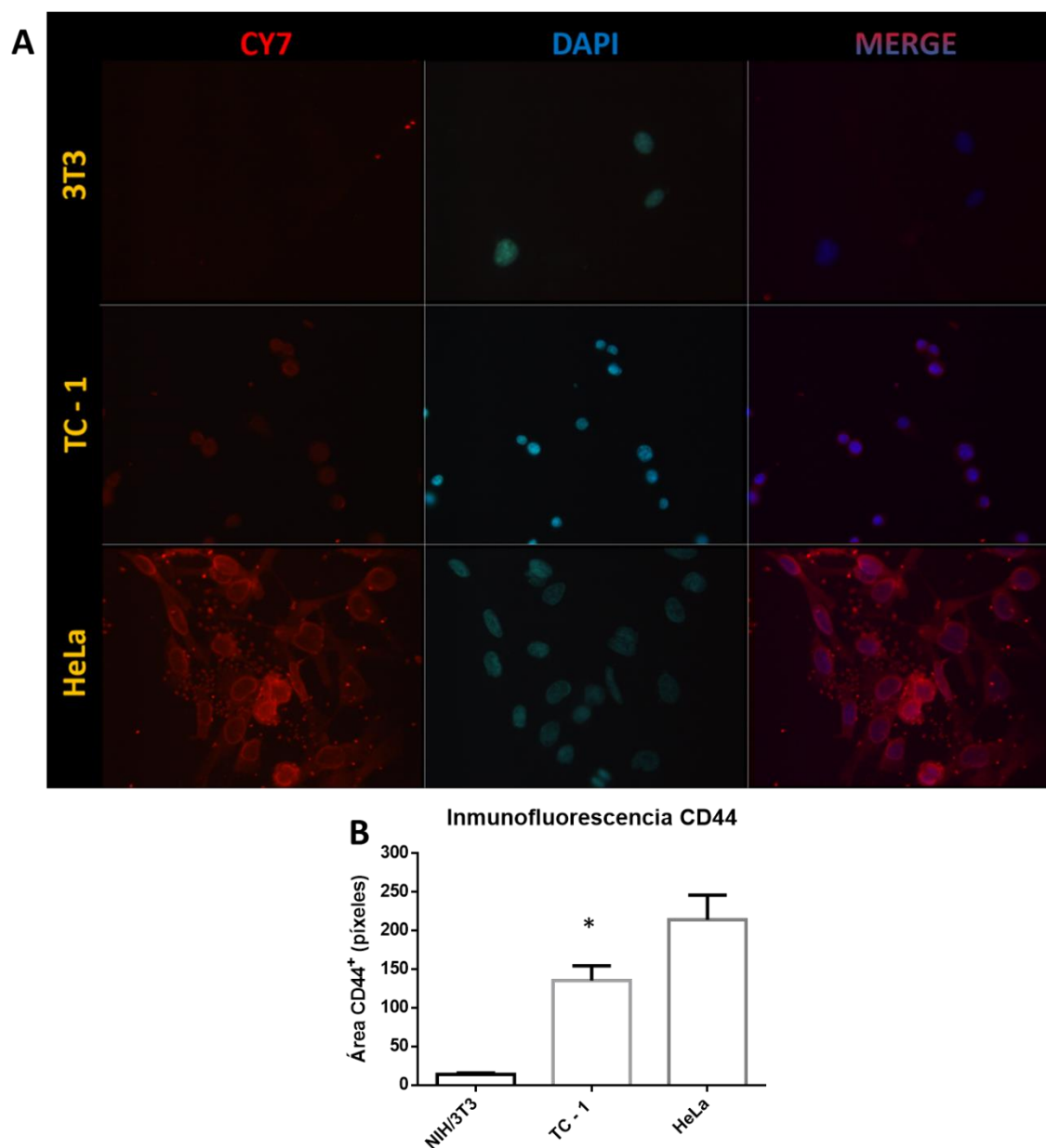


Figura 7.10. Análisis por inmunofluorescencia para detectar el receptor CD44 en las células tumorales y no tumorales. A) Micrografías de las inmunofluorescencias contra CD44 de las células NIH / 3T3, TC – 1 y HeLa, 400X. B) Cuantificación de la inmunofluorescencia para CD44. * = $p < 0.05$ vs NIH / 3T3, T de Student, $n = 3$.

En el ensayo de inmunofluorescencia, las células NIH / 3T3 de naturaleza no tumoral, no mostraron una presencia importante del receptor de HA. En cambio, en las células tumorales TC – 1, la señal positiva de color rojo brillante es evidentemente clara. Asimismo, en las células HeLa de adenocarcinoma de cérvix, se observa una gran expresión del receptor, estas últimas fueron utilizadas como control positivo (Fig. 7.10A). Además, la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en las células mostró una amplia diferencia significativa entre la presencia del receptor en las células no tumorales (Fig. 7.10B), donde la intensidad promedio fue de 13.89 ± 1.84 , en comparación con las tumorales donde fue de 135.4 ± 18.83 . En conjunto, esta evidencia prueba que la presencia del receptor del HA se encuentra de manera más abundante en las células tumorales que en las no tumorales, demostrando así que las primeras son un blanco potencial para el uso de nanovectores que cuenten con HA, pues internalizarán el nanovector de manera más específica y eficiente.

7.3.2 Análisis de la selectividad de los nanovectores *in vitro* mediante morfometría con microscopía de luz.

Dado que los nanovectores se internalizan en las células tumorales y no tumorales por medio de endocitosis mediada por receptores o por fagocitosis, se forman vesículas intracitoplásmicas que pueden ser identificadas por microscopía de luz, utilizando la técnica de cortes semifinos con la tinción de azul de toluidina. En este estudio, se realizó la cuantificación de células que presentaban vesículas endocíticas con nanovectores en su interior, evaluando de esta manera que tan selectivos son los nanovectores para internalizarse en células tumorales y no tumorales dependiendo de su composición.

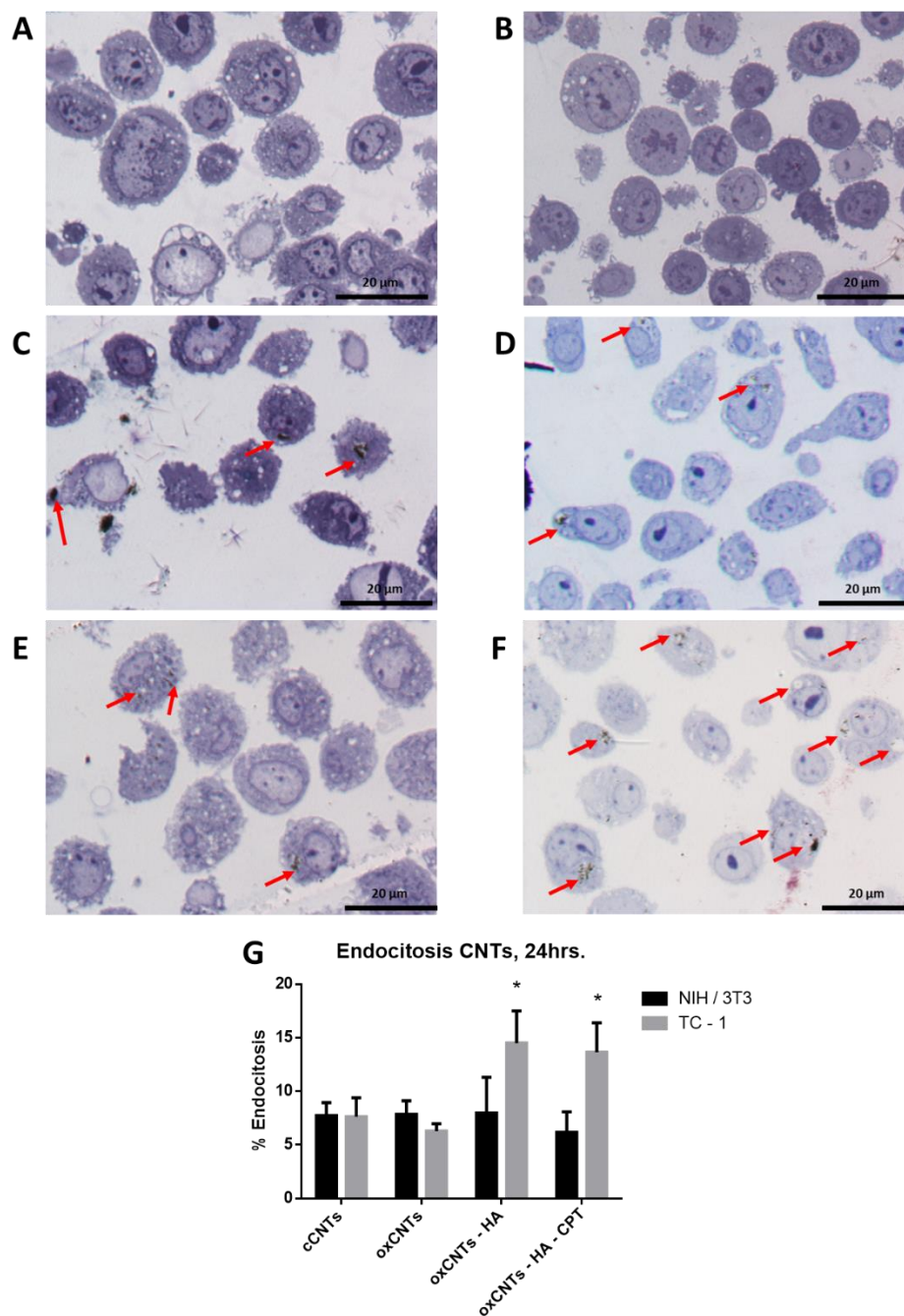


Figura 7.11 Evaluación de la endocytosis de los nanovectores por microscopía de luz en cortes semifinos. A) Células NIH / 3T3, 1000X. B) Células TC - 1, 1000X. C) Células NIH / 3T3 tratadas con cCNTs, 1000X. D) Células TC - 1 tratadas con cCNTs, 1000X. E) Células NIH / 3T3 tratadas con oxCNTs - HA - CPT, 1000X. F) Células TC - 1 tratadas con oxCNTs - HA - CPT, 1000X. G) Cuantificación de las células c/vesículas endocíticas en función del tipo de nanovector administrado. * = p < 0.05 vs NIH / 3T3 con el mismo tratamiento, T de Student, n = 5.

Después de la administración de los tratamientos con los nanovectores durante 24 h a las células TC-1 y NIH / 3T3, encontramos que la captura celular de los nanovectores era diferente dependiendo de las células y del tipo de nanovector.

Primeramente, se realizaron las observaciones de ambos tipos celulares sin administración de nanovectores, para evaluar las características celulares de cada línea. Se puede observar como las células NIH / 3T3, presentan un tamaño grande, con núcleos heterocromáticos. En cambio, las células tumorales TC – 1, generalmente son de menor tamaño y presentan múltiples eventos mitóticos al estar en constante división celular, signo particular de su naturaleza tumoral (Fig. 7.11A, B).

Posteriormente, se trataron ambos tipos celulares con los cCNTs, y se observó que presentaban un nivel similar de endocitosis tanto en las células tumorales como en las no tumorales, mostrando vesículas endocíticas muy densas y a veces de gran tamaño (Fig. 7.11C, D). Por otra parte, cuando las células tumorales fueron tratadas con nanovectores que poseen HA y cargados con CPt, se observó un evidente incremento en el número de células con vesículas endocíticas en comparación con las células no tumorales tratadas con el mismo nanovector (Fig. 7.11E, F), este incremento en las células tumorales resultó estadísticamente significativo (Fig. 7.11G). En conjunto, esta evidencia prueba que las células tumorales TC - 1 son selectivamente más susceptibles a la internalización de los nanovectores que presentan HA.

7.3.3 Evaluación de la selectividad de los nanovectores *in vitro* mediante morfometría con microscopia electrónica de transmisión.

Las vesículas endocíticas, son estructuras citoplasmáticas de forma esférica, elíptica o irregular, formadas principalmente por una doble membrana que se encuentra circundando el material endocitado que en este caso son CNTs. Como observamos que las células tumorales **presentaban preferencia para endocitar nanovectores con HA**, decidimos utilizar TEM para determinar la apariencia y cantidad de vesículas endocíticas en las células tumorales en función de la construcción del nanovector.

Al ser analizadas mediante TEM, las células tumorales TC - 1 presentaban organelos poco estructurados, mitocondrias con membranas internas discontinuas y frecuentes eventos mitóticos (Fig. 7.12A, B).

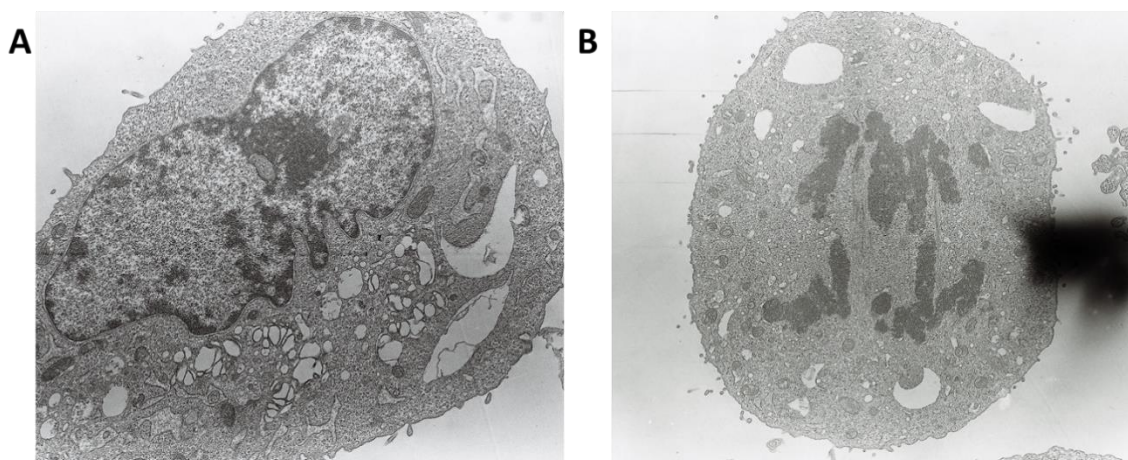


Figura 7.12 Micrografías electrónicas de las células tumorales TC - 1. A) Célula TC - 1 en interfase, 4400x. B) Células TC - 1 en anafase (División celular), 4400x.

Al ser tratadas con cCNTs, las células tumorales mostraban vesículas endocíticas de gran tamaño y con una cantidad considerable de nanovectores dentro de ellas (Fig. 7.13A), inclusive, pudimos evidenciar el proceso fagocítico en una célula tumoral, donde se observaban las proyecciones citoplasmáticas para englobar el material que está en proceso de ser fagocitado (Fig. 7.13B).

Por otra parte, cuando las células tumorales fueron tratadas con los oxCNTs – HA – CPt (Fig. 7.13C), se pudo observar un incremento significativo en la cantidad de vesículas endocíticas presentes en comparación con las observadas en las células tratadas con los cCNTs (Fig. 7.13D). Comprobando así, tanto por microscopía de luz, como por TEM, que los nanovectores que poseen HA, tienen mayor capacidad para internalizarse en células tumorales mediante endocitosis mediada por receptores, lo que les confiere un efecto de especificidad antitumoral.

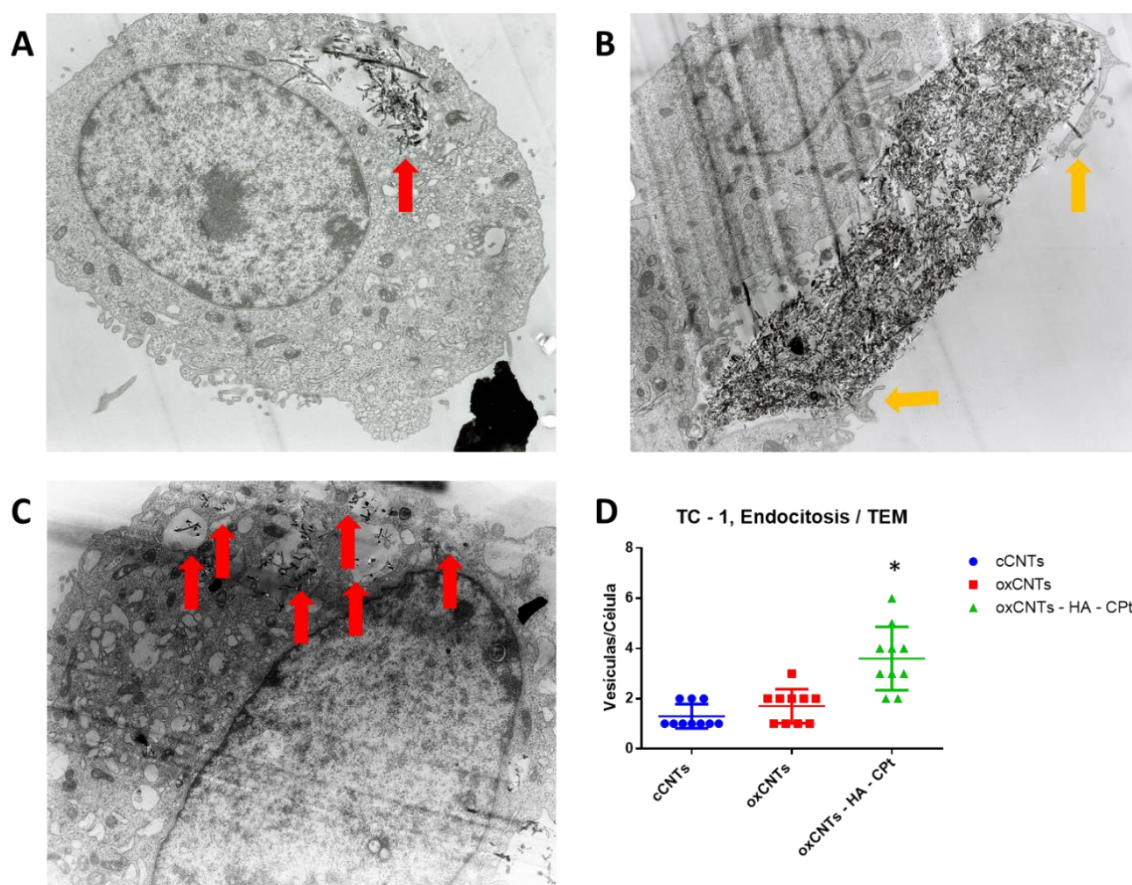


Figura 7.13. Análisis de la endocitosis de los nanovectores por TEM. A) Célula TC – 1 con vesícula endocítica de cCNTs (Flecha roja), 4400X B) Célula TC – 1 con proceso endocítico de cCNTs, proyecciones citoplasmáticas (flecha naranja), 7000X. C) Células TC – 1 con vesículas endocíticas de oxCNTs – HA – CPt (flechas rojas), 4400X. D) Cuantificación de las vesículas con nanovectores en respuesta a los nanovectores.

* = p < 0.05 vs cCNTs, T de Student, n = 10.

7.4 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DEL EFECTO ANTINEOPLÁSICO DE LOS NANOVECTORES *IN VIVO*.

7.4.1 Análisis del efecto antitumoral de los nanovectores mediante la medición de los animales y de los tumores extirpados.

En el modelo murino de cáncer que se realizó en este estudio, los ratones fueron inoculados con células tumorales TC – 1. Las células tumorales fueron implantadas en el tejido subcutáneo en el flanco izquierdo, posteriormente, una vez que se desarrollaron los tumores (14 días) los tratamientos fueron administrados *in situ*. De acuerdo con el tratamiento recibido los ratones se dividieron en 5 grupos: vehículo (PBS), tratamiento convencional (CPt), nanotubos comerciales (cCNTs), nanotubos funcionalizados con HA (oxCNTs – HA) y el nanovector cargado con CPt (oxCNTs – HA – CPt).

El peso corporal de los ratones fue monitoreado para tener referencia de la salud general de los animales. En general, todos los grupos de estudio mostraron una buena estabilidad del peso a excepción del grupo tratado con el vehículo (PBS), donde se observó una reducción significativa del peso comparado contra el grupo con el nanovector final; la cual se acentuaba a medida que el modelo llegaba a su final, lo que puede ser indicativo de pérdida de apetito o de energía para obtener el alimento. (Fig. 7.14A)

Como parte de la evaluación de la eficacia antitumoral de los nanovectores, se evaluaron los pesos de los tumores una vez extirpados y fijados para conocer si existían diferencias entre los distintos tratamientos, donde un mayor efecto antitumoral se traduciría en un menor peso tumoral. En este análisis, el grupo tratado con los oxCNTs – HA – CPt mostró una ligera tendencia de disminución del peso de los tumores comparado contra los demás grupos,

incluyendo el grupo de CPt, sin embargo, esta diferencia no es significativa, pues la dispersión en el peso de los tumores fue muy alta, por lo que se deben realizar más pruebas para confirmar este resultado. (Fig. 7.14B)

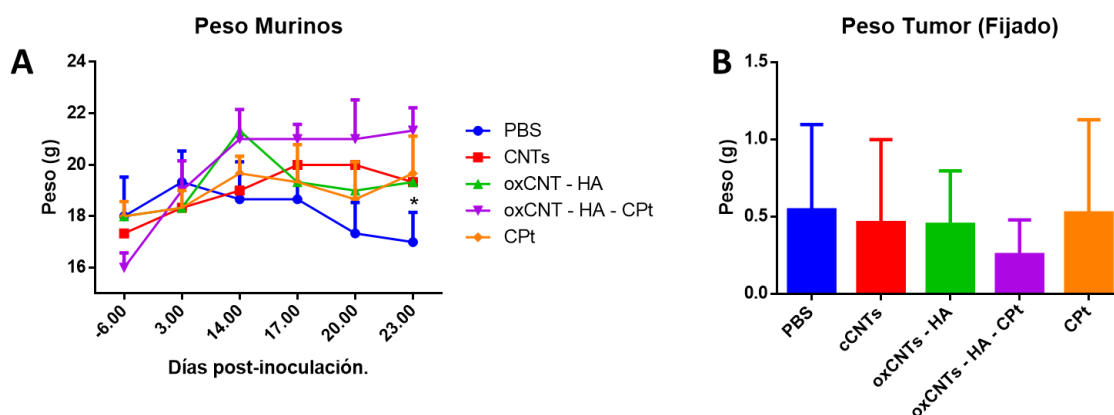


Figura 7.14 Evaluación del peso corporal y del peso tumoral de los murinos en el modelo *in vivo*. A) Medición del peso corporal en función del tiempo del modelo. B) Medición de los pesos tumorales en función del tipo de nanovector administrado. * = $P < 0.05$, Prueba T de Student vs oxCNTs – HA – CPT.

7.4.2 Evaluación de la eficacia antitumoral de los nanovectores mediante análisis histopatológicos por microscopía de luz.

Para conocer las interacciones de los nanovectores con el organismo de los animales, los tumores y los órganos fueron extraídos y analizados mediante la técnica histológica convencional en microscopio de luz. La organización histológica y signos de inflamación o daño tisular fueron evaluados para conocer los efectos de los nanovectores en este modelo. Además, la presencia y ubicación de los nanovectores también fue analizada en los distintos tejidos para conocer su distribución y difusión en los murinos.

Lo primero que se evaluó fue la estructura histológica y presencia de los nanovectores en los tumores de los murinos. Los tumores de los animales tratados solamente con el vehículo

presentaron gran crecimiento tumoral, una densidad celular elevada, estructuras vasculares abundantes y múltiples eventos mitóticos (Fig. 7.15).

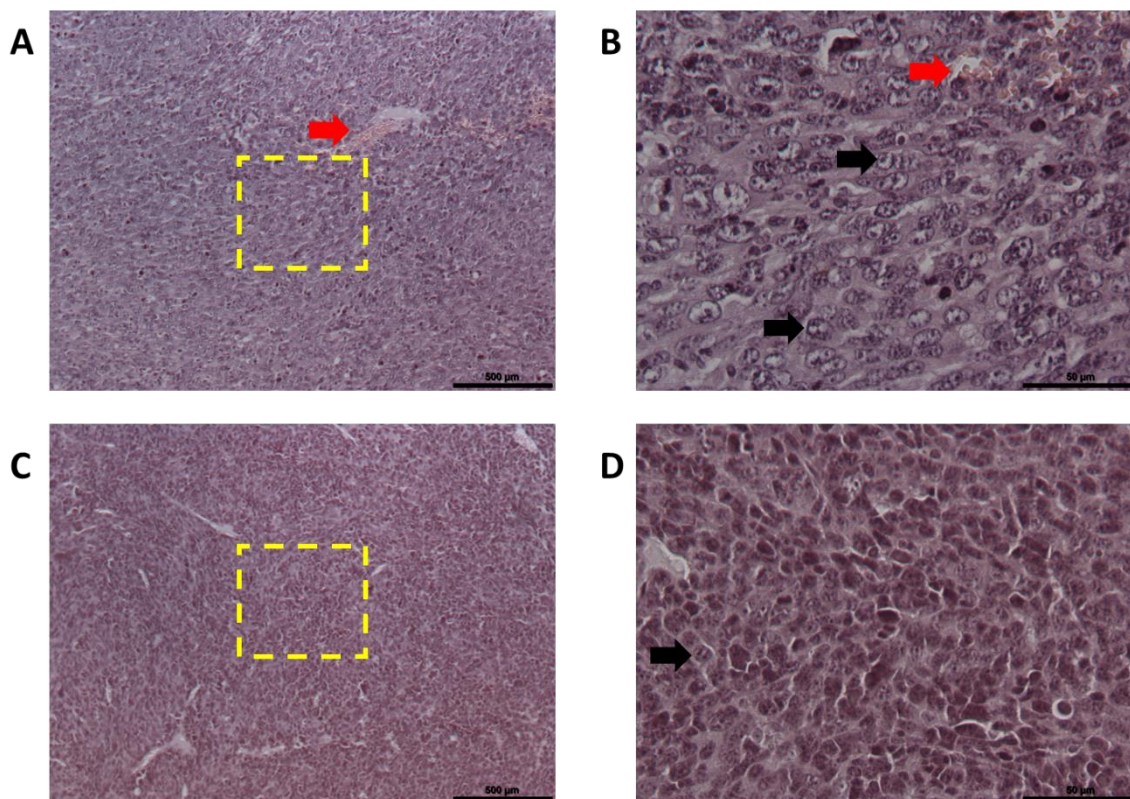


Figura 7.15. Evaluación morfológica de los tumores del grupo PBS en el modelo *in vivo*. A) Tumor con angiogénesis (flecha roja), 100X. B) Amplificación del recuadro de A) con múltiples eventos mitóticos (flechas negras) y capilares (flecha roja), 400X C) Tumor en objetivo panorámico, 100X. D) Amplificación del recuadro en C) con eventos mitóticos (flecha negra), 400X.

Así mismo, los tejidos tumorales de los animales tratados con los cCNTs mostraban también gran crecimiento, angiogénesis, eventos mitóticos evidentes además de que las zonas periféricas del tumor se encontraban formando anclajes en las capas musculares adyacentes. De manera interesante, en estos tumores era discernible la presencia de cCNTs, en muy baja cantidad y formando aglomerados muy densos distribuidos entre las células del tumor y ocasionalmente en las estructuras vasculares (Fig. 7.16).

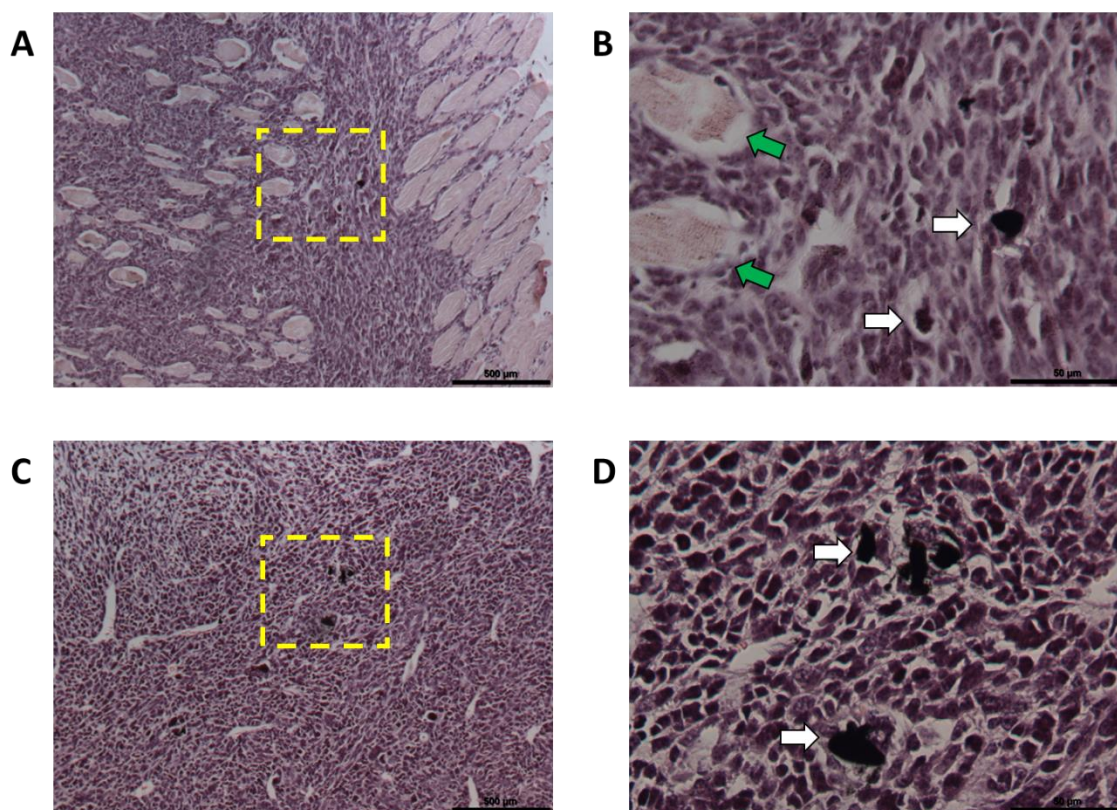


Figura 7.16 Evaluación morfológica de los tumores del grupo cCNTs del modelo *in vivo*. A) Tumor con inserciones en la capa muscular a bajo aumento, 100X. B) Amplificación del recuadro en A) donde se observan aglomerados densos de cCNTs (flechas blancas) y fibras musculares definidas (flechas verdes), 400X C) Tumor a bajo aumento, 100X. D) Amplificación del recuadro en C) que detalla los aglomerados de cCNTs (flechas blancas), 400X.

En los tumores extraídos del grupo de animales tratados con los oxCNTs – HA, se pudieron observar diferencias notables en comparación con los cCNTs. En estos tumores, los nanovectores se observaban un poco más dispersos, con mayor presencia intratumoral y la ubicación se encontraba tanto entre las células tumorales como en zonas adyacentes o dentro de las estructuras vasculares del tumor, evidenciando una mayor capacidad hidrofílica, favoreciendo también al efecto de permeabilidad y retención causado por la angiogénesis del tumor. (Fig. 7.17).

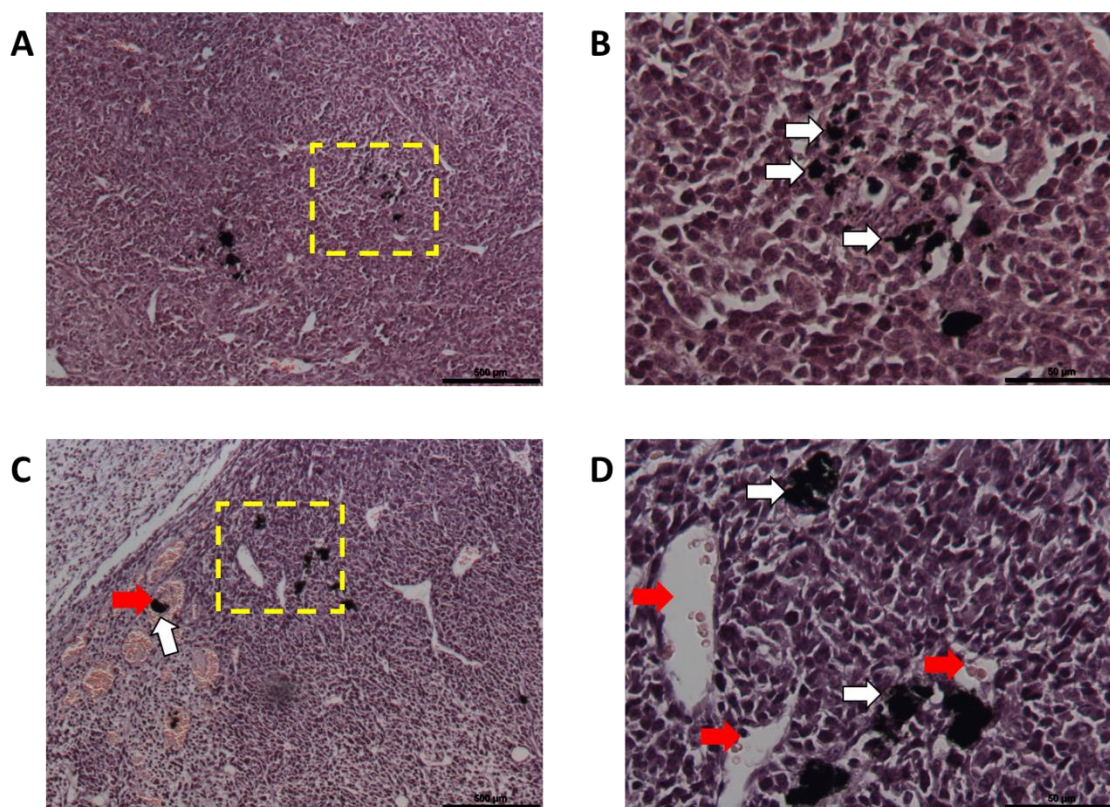


Figura 7.17 Evaluación morfológica de los tumores del grupo oxCNTs – HA del modelo *in vivo*. A) Tumor en objetivo panorámico, 100X. B) Amplificación del recuadro en A) donde se observan aglomerados de oxCNTs – HA con menor densidad y tamaño en comparación con los de cCNTs, 400X. C) Tumor en objetivo panorámico, con múltiples estructuras vasculares (Flechas rojas) y presencia de oxCNTs – HA (Flecha blanca), 100X. D) Amplificación del recuadro en C), se detallan las estructuras vasculares (flechas rojas) y la presencia elevada de nanovectores (flechas blancas), 400X.

Como se esperaba, los efectos observados con los oxCNTs – HA, también se presentaron en los tumores de los animales tratados con los oxCNTs – HA – CPt, solo que, en estos, la dispersión y cantidad de nanovectores fue mucho mayor. Como se puede observar, la presencia de los oxCNTs – HA – CPt en las células tumorales y estructuras vasculares es bastante evidente y los aglomerados de nanovectores son mucho más pequeños, demostrando su excelente solubilidad en los tejidos, provocando que su efecto de retención y permeabilidad en el tumor se incremente. Además, encontramos ciertas zonas donde la

densidad celular es reducida, lo que puede ser indicativo de la eficacia en el efecto antitumoral (Fig. 7.18).

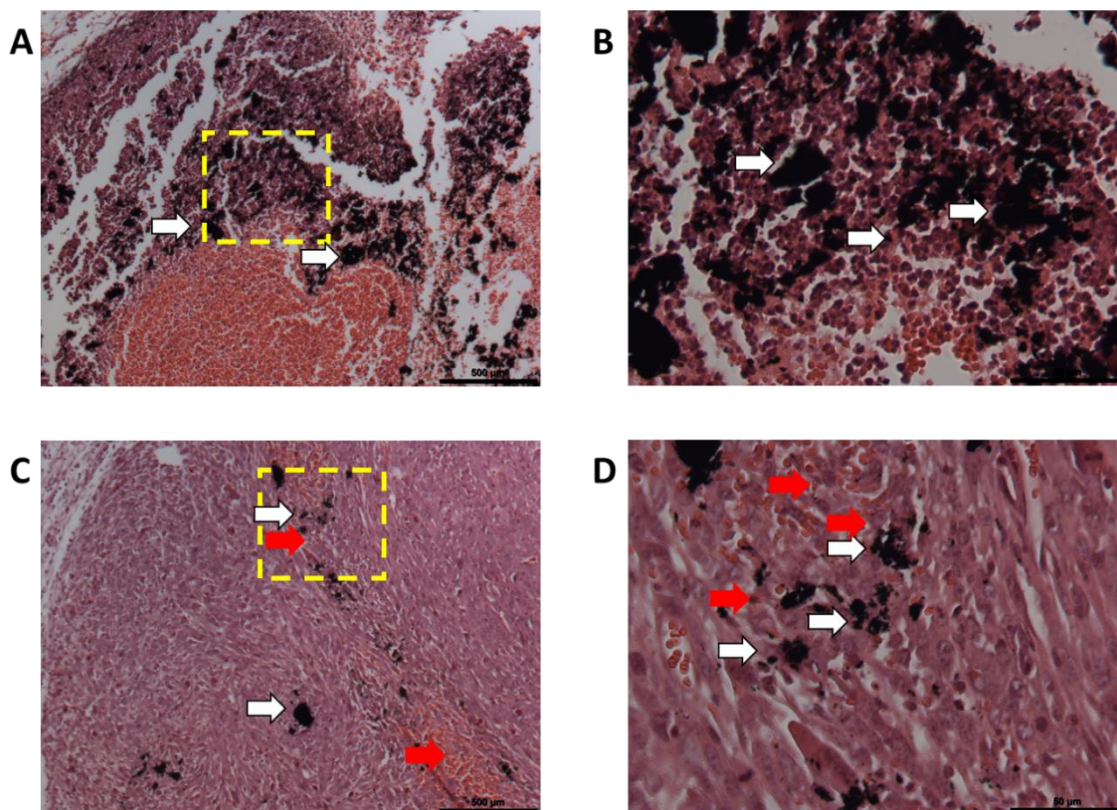


Figura 7.18 Evaluación morfológica de los tumores del grupo oxCNTs – HA – CPt del modelo *in vivo*. A) Tumor en objetivo panorámico donde se observa una extensa presencia de los nanovectores (flechas blancas), 100X. B) Amplificación del recuadro en A), se aprecia una elevada presencia de nanovectores de distintos tamaños, con elevada dispersión, 400X. C) Tumor con objetivo panorámico, se observan abundantes nanovectores y estructuras vasculares (flechas rojas), 100X. D) Amplificación del recuadro en C) en donde se distinguen nanovectores (flechas blancas) en las zonas adyacentes y en la parte interna de las estructuras vasculares (flechas rojas), 400X. Fotos provenientes de 2 animales distintos.

Por último, los tumores de los animales tratados con la terapia convencional de CPt presentaban una morfología muy similar a los que solamente se trataron con el vehículo, con una alta densidad celular, estructuras vasculares irregulares y múltiples eventos mitóticos (Fig. 7.19). En conjunto, estas observaciones evidencian la buena dispersión y solubilidad

intratumoral que presentan los nanovectores funcionalizados con HA y cargados con CPT administrados de forma *in situ*. Además, hay indicios de su mayor poder terapéutico en comparación con la terapia convencional de CPT.

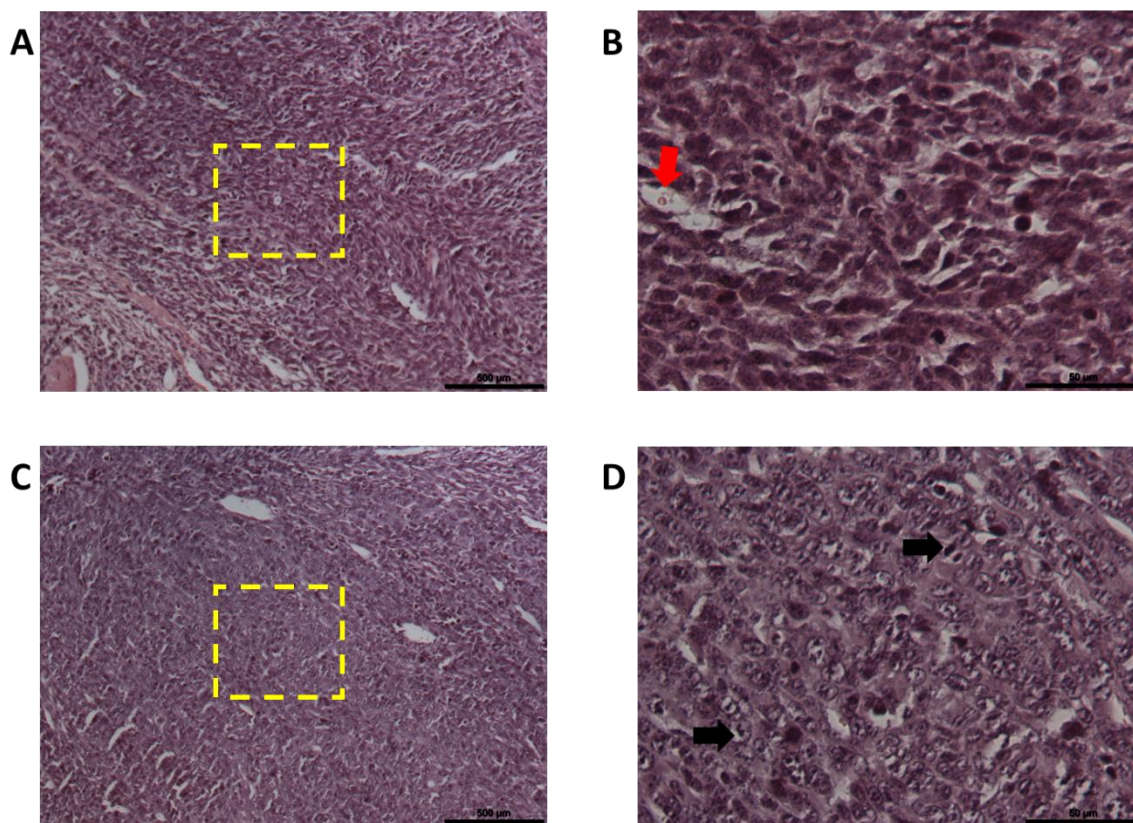


Figura 7.19 Evaluación morfológica de los tumores del grupo CPT del modelo *in vivo*. A) Tumor a bajo aumento, 100X. B) Amplificación del recuadro en A) donde se observan estructuras vasculares irregulares (Flechas rojas), 400X. C) Tumor a bajo aumento, 100X. D) Amplificación del recuadro en C), se detallan los múltiples eventos mitóticos (flechas negras), 400X.

7.4.3 Evaluación de la seguridad terapéutica de los nanovectores mediante análisis histopatológicos de los órganos vitales de los murinos.

Además de la eficacia antitumoral, otro aspecto importante a evaluar en los sistemas de entrega de fármacos es su seguridad terapéutica, es decir, que su administración no genere daños o alteraciones en otros tejidos más que el que se tiene como objetivo. Para esto,

evaluamos la estructura histológica, signos de inflamación y presencia de los nanovectores correlacionándolo con la existencia o ausencia de daño tisular, así como para conocer la distribución de los nanovectores en el organismo. Los órganos analizados fueron el hígado, riñón, pulmón, corazón, cerebro y bazo, siendo los primeros tres de especial importancia debido al papel que tienen en el metabolismo de fármacos y homeostasis sistémica.

El hígado, al ser el órgano que metaboliza la mayoría de los fármacos, suele ser afectado por la toxicidad de estos, y se sabe que el CPT causa una importante hepatotoxicidad, por lo que decidimos analizar este órgano primero. En los hígados de los animales que recibieron solamente el vehículo como tratamiento, se puede observar una estructura histológica normal, sinusoides hepáticos bien definidos, con hepatocitos de núcleo heterocromático, sin rastros de inflamación ni edema (Fig. 7.20A, B). En cambio, cuando los animales fueron con CPT, se puede observar claramente que los sinusoides pierden su organización, existen zonas con edema y los hepatocitos tienen un citoplasma con abundantes vesículas (Fig. 7.20C, D), lo cual es indicativo de un proceso patológico conocido como esteatosis hepática, que es frecuentemente causado por fármacos. De manera interesante, estos signos de daño tisular y edema no se presentan en los hígados de los animales tratados con los oxCNTs – HA – CPT, donde se observa un parénquima de características tisulares normales (Fig. 7.20 E, F) comprobando que al usar estos nanovectores, se puede reducir en gran medida de la hepatotoxicidad inducida por el CPT en este modelo.

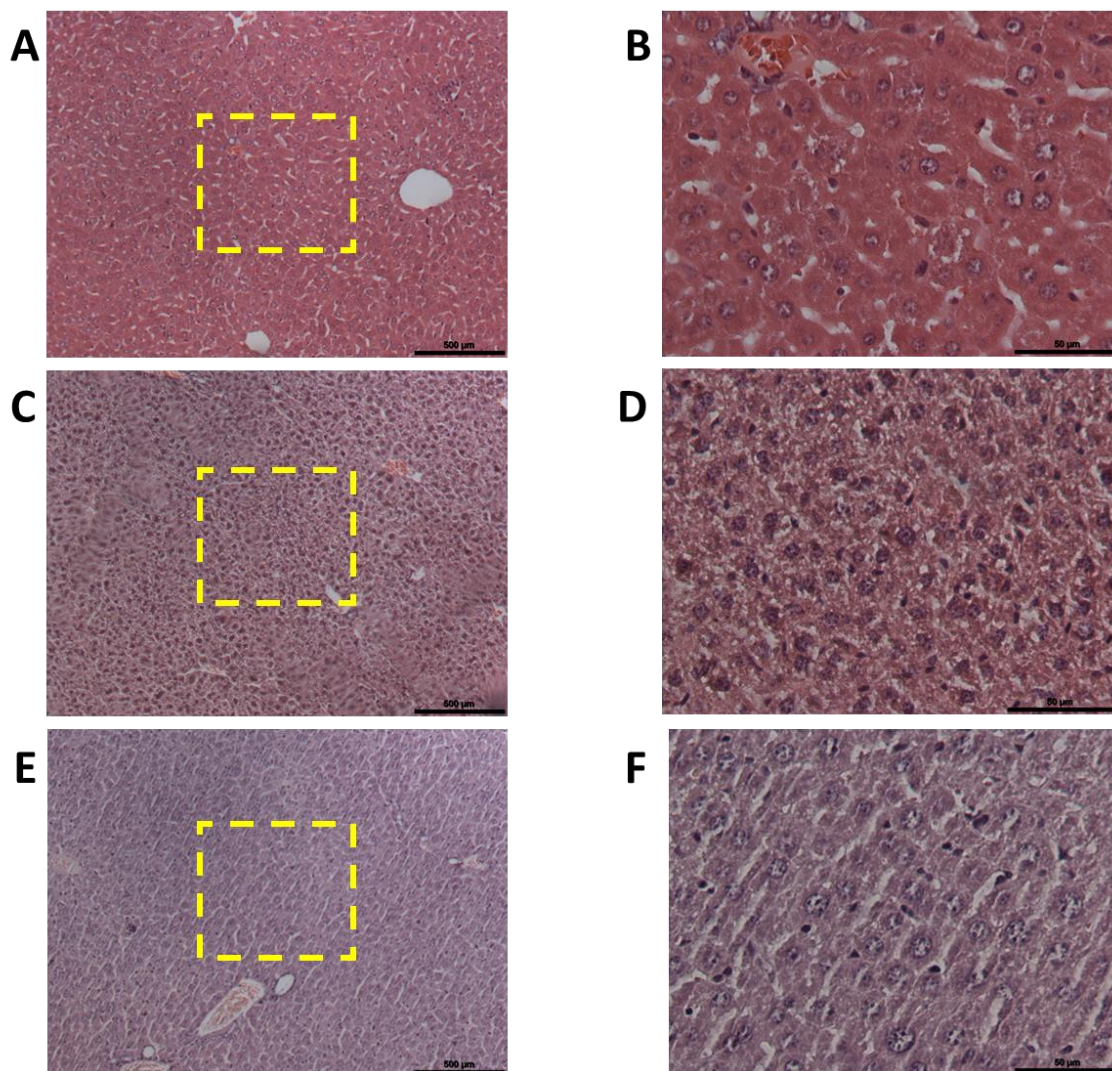


Figura 7.20 Evaluación morfológica del hígado en el modelo *in vivo*. A) Hígado del grupo PBS a bajo aumento, 100X. B) Amplificación del recuadro en A) donde se observa parénquima hepático normal, sinusoides hepáticos definidos, 400X. C) Hígado del grupo CPT a bajo aumento, 100X. D) Amplificación del recuadro en C), se observa un parénquima hepático con características de esteatosis hepática, sinusoides discontinuos y sin orientación, hepatocitos con abundantes vesículas, 400X. E) Hígado del grupo oxCNTs – HA – CPT a bajo aumento, 100X. F) Amplificación del recuadro en E), se detalla un parénquima hepático normal, sin presencia de nanovectores, 400X.

Los pulmones son otro órgano vital muy importante en este estudio, y esto se debe a que los CNTs administrados por vía sanguínea pueden tener un cierto tiempo de residencia en estos por la retención física del lecho capilar, de forma similar que como ocurre en los tumores.

Primeramente, evaluamos los pulmones de los ratones tratados con el vehículo, donde pudimos observar un parénquima pulmonar sano, sin evidencia de inflamación ni edema, con estructuras alveolares íntegras y una presencia adecuada de macrófagos (Fig. 7.21A, B). Por otra parte, los pulmones de los ratones tratados con los cCNTs mostraron presencia muy escasa de nanovectores, formando aglomerados de color negro y de tamaño considerable en los alvéolos pulmonares. De forma interesante, estos nanovectores no estaban causando ningún tipo de respuesta inflamatoria o edema, por lo que al parecer son inocuos a este nivel (Fig. 7.21C, D). Así mismo, en los pulmones de los animales tratados con oxCNTs – HA – CPt, también encontramos nanovectores presentes, en los alvéolos pulmonares, aunque en este caso, su presencia fue más elevada en comparación con los pulmones del grupo tratado con cCNTs, debido a su dispersabilidad y solubilidad incrementada. Así mismo, los aglomerados de este tipo de nanovectores fueron de menor tamaño y tampoco estaban causando ningún tipo de respuesta inflamatoria o edema (Fig. 7.21E, F). Por lo que puede decirse que al menos con las características utilizadas en este modelo, los nanovectores no representan un peligro para este órgano vital.

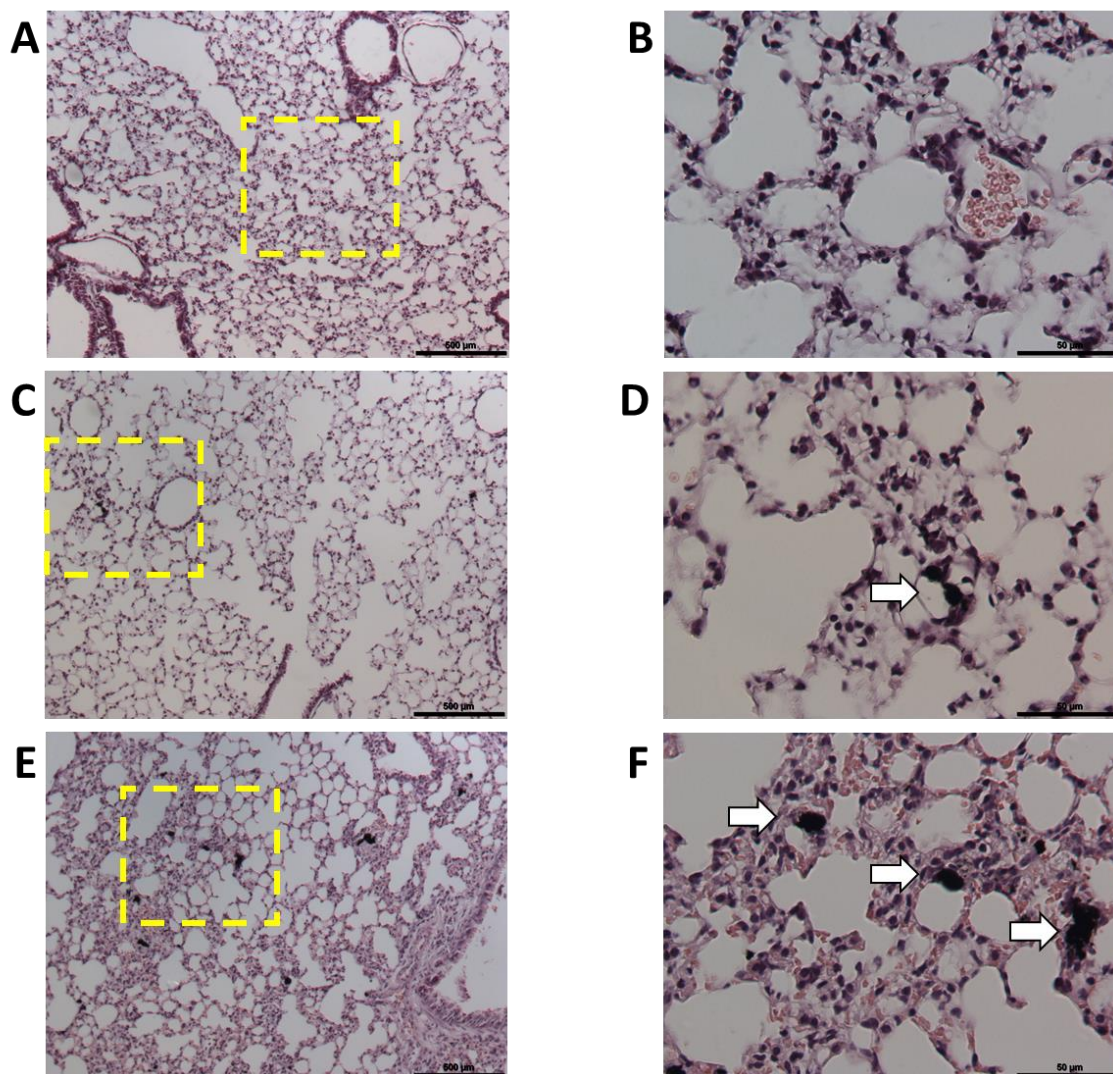


Figura 7.21 Evaluación morfológica de los pulmones del modelo *in vivo*. A) Pulmón del grupo PBS a bajo aumento, 100X. B) Amplificación del recuadro en A), se observan parénquima pulmonar normal, con espacios aéreos alveolares íntegros, sin inflamación ni edema, 400X. C) Pulmón del grupo cCNTs a bajo aumento, 100X. D) Amplificación del recuadro en C), se detalla la presencia escasa de nanovectores (flechas blancas), con parénquima pulmonar normal, sin inflamación ni edema, 400X E) Pulmón del grupo oxCNTs – HA – CPt a bajo aumento, 100X) F) Amplificación del recuadro en E), aunque se distingue la presencia considerable de nanovectores (flechas blancas), persiste un parénquima pulmonar normal, sin inflamación ni edema, 400X.

Otro órgano muy importante en el procesamiento de los metabolitos de fármacos platinados es el riñón. Hasta el momento se conoce que el CPt tiene un perfil de toxicidad muy bajo en

este órgano. Sin embargo, es importante conocer sus efectos sobre el riñón, al ser eliminado por esta vía en casi un 70%; además, también es la principal vía de eliminación de los CNTs. En los análisis histológicos, los riñones extraídos de los animales de todos los grupos presentaron una estructura histológica del parénquima de la corteza y médula renal completamente normales. Con glomérulos bien definidos, túbulos contorneados proximales y distales íntegros, sin signos de inflamación ni edema, inclusive aquellos pertenecientes al grupo de los tratados convencionalmente con CPt (Fig. 7.22).

Por último, también se analizaron otros órganos vitales como corazón, cerebro y bazo de los ratones tratados con los oxCNTs – HA – CPt para conocer si se presentaba residencia de los nanovectores en estos órganos. Además, para analizar si la presencia directa o indirecta de los nanovectores, causaba alguna alteración tisular o respuesta inflamatoria. En ninguno de los corazones analizados se encontraron anomalías ni presencia de los nanovectores, las fibras musculares estaban bien definidas, sin signos de fibrosis ni inflamación (Fig. 7.23a, b). Así mismo, los cerebros evaluados de los animales tratados con oxCNTs – HA – CPt tampoco mostraban algún tipo de alteración histológica, las capas neuronales presentaban una integridad adecuada, los cuerpos neuronales de aspecto estrellado se hallaban bien definidos y no se observó incremento de las células gliales ni presencia de nanovectores (Fig. 7.23c, d). Por último, en los bazos analizados tampoco se hallaron rastros de nanovectores, la pulpa blanca no mostraba signos de proliferación atípica y la pulpa roja era de proporción adecuada (Fig. 7.23e, f). Estos datos muestran el alto grado de seguridad sistémica que existe al administrar estos nanovectores al menos en las condiciones dispuestas en este modelo. Además, la administración de estos nanovectores no provoca el daño hepático causado por la terapia convencional de CPt.

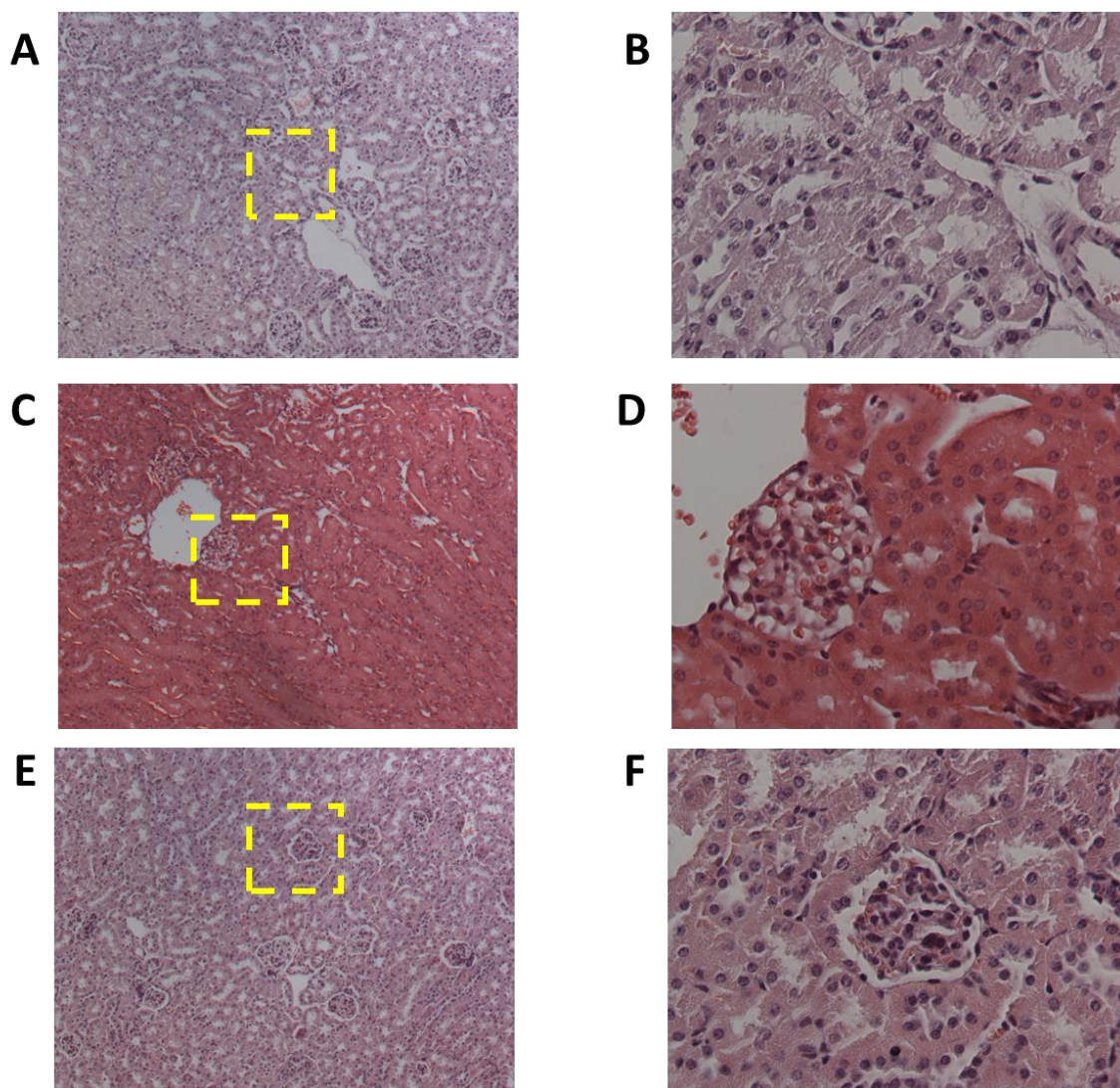


Figura 7.22 Evaluación morfológica de los riñones en el modelo *in vivo*. A) Riñón del grupo PBS a bajo aumento, 100X. B) Amplificación del recuadro en A), parénquima renal normal, 400X C) Riñón del grupo oxCNTs – HA – CPt a bajo aumento, 100X. D) Amplificación del recuadro en C), parénquima renal normal, no existe presencia de nanovectores, 400X. E) Riñón del grupo CPt a bajo aumento, 100X. F) Amplificación del recuadro en E), parénquima renal normal, 400X

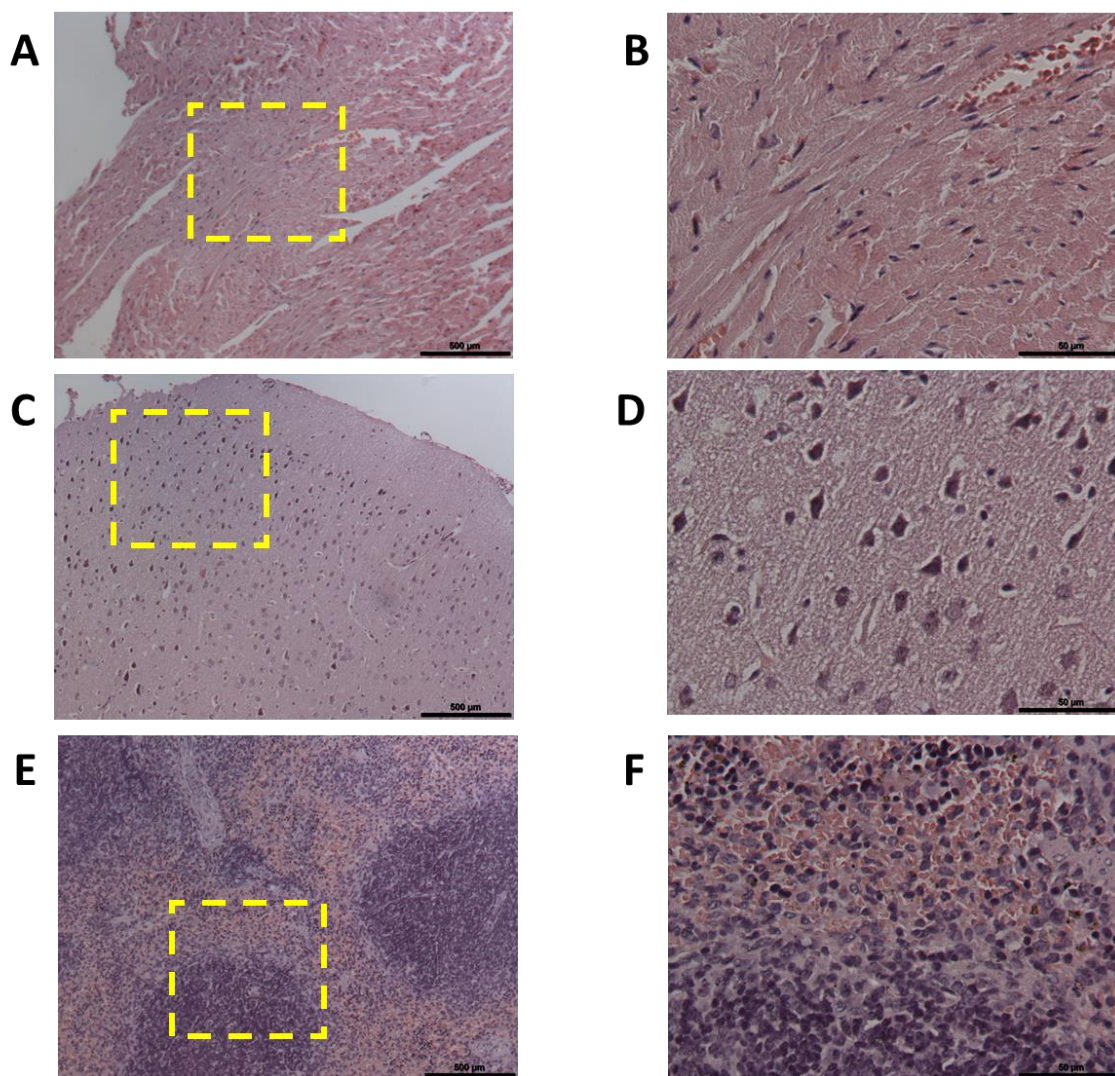


Figura 7.23. Evaluación morfológica del corazón, cerebro y bazo del grupo oxCNTs – HA – CPt en el modelo *in vivo*. A) Corazón del grupo oxCNTs – HA – CPt a bajo aumento, 100X. B) Amplificación del recuadro en A), se observan fibras musculares cardíacas de estructura normal, sin presencia de nanovectores, 400X. C) Cerebro del grupo oxCNTs – HA – CPt a bajo aumento, 100X. D) Amplificación del recuadro en C), se detalla corteza cerebral con neuronas y glia de aspecto normal, sin presencia de nanovectores, 400X E) Bazo del grupo oxCNTs – HA – CPt a bajo aumento, 100X. F) Amplificación del recuadro en E) donde se distingue pulpa blanca y pulpa roja de aspecto normal, sin presencia de nanovectores, 400X.

DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

En la actualidad, la nanomedicina es un campo que está revolucionando la forma de practicar la medicina, desde las pruebas de diagnóstico que se realizan en el laboratorio hasta la manera en que a un paciente se le administra su medicamento, este rubro ha tenido importantes innovaciones y aportaciones.

Específicamente en la quimioterapia contra cáncer, los sistemas de entrega de fármacos utilizando nanotecnologías han sido de gran ayuda en los últimos años para eficientizar los efectos antineoplásicos e incrementar la seguridad de los fármacos, al reducir la toxicidad sistémica.⁹⁴ En este sentido, los fármacos basados en platino como el cisplatino, oxaliplatino o CPT, son ampliamente utilizados por su mecanismo de acción efectivo, sin embargo, presentan poca retención en el organismo, además, causan severos efectos tóxicos a distintos órganos, lo que los hace candidatos ideales para este tipo de sistemas.⁹⁵

Existen muchos tipos de nanopartículas que pueden ser utilizadas para crear sistemas de entrega de fármacos o nanovectores, una de ellas que ha tomado gran importancia en la última década por sus propiedades fisicoquímicas son los CNTs,⁴² los cuales tienen la capacidad de anclar una gama muy extensa de componentes a su superficie, además de contar con un gran espacio para carga de moléculas, siendo así muy versátiles para su aplicación en terapias específicas, como en cáncer.⁹⁶

Así, con la finalidad de mejorar la eficacia y la seguridad en la administración de fármacos platinados, en este estudio, nos dedicamos a diseñar, caracterizar y aplicar un nanovector basado en CNTs para entregar CPT en modelos de cáncer *in vitro* e *in vivo*.

Debido a que existe una gran diversidad de sistemas de entrega de fármacos en cuanto a su estructura y componentes, estos deben de ser extensamente caracterizados para conocer la

conformación del nanovector, la cual sufre cambios importantes a medida que se va desarrollando el proceso de síntesis. Para esto, se utilizan diversas técnicas microscópicas, espectroscópicas y fisicoquímicas, las cuales ofrecen información detallada sobre la composición del nanovector en cada paso.

La primera técnica utilizada para caracterizar nuestro nanovector fue la TEM, esta técnica es capaz de revelar los cambios morfológicos tales como el espesor de las paredes de los CNTs, presencia de componentes en sus paredes o en su espacio interior ^{73,97}, así como en su estado de agregación/dispersión, lo que se relaciona con su naturaleza fisicoquímica.⁹⁸

En nuestro estudio, utilizamos como punto de partida los cCNTs, los cuales están levemente funcionalizados con COOH en un grado muy bajo. Estos presentaron un estado de agregación bastante elevado, se encontraban muy enredados en medio acuoso, lo que indica una fuerte hidrofobicidad, además sus paredes se observaban delgadas y homogéneas con espacios centrales vacíos, estos datos son compatibles con CNTs de carácter pristínico, es decir, completamente desfuncionalizados, conformados solamente por la estructura grafénica.^{99,100}

Por otra parte, los nanovectores oxidados y acoplados a HA, presentaban paredes de aspecto heterogéneo y más gruesas, signo de que existe funcionalización de moléculas de HA que están formando capas en la superficie de los CNTs,¹⁰¹ y en los espacios centrales, se discierne un puntilleo electrodenso fino, que corresponde al fármaco platinado cargado.⁸² Además, la dispersión en medios acuosos de estos nanovectores fue mucho mejor y el tamaño de los aglomerados se redujo, esto principalmente causado por el incremento en la hidrofiliidad que le provee el HA, que genera mayor repulsión electrostática⁸⁷ y mayor cantidad de puentes de hidrógeno que estabilizan el sistema.⁴⁹

Otra técnica utilizada en nuestro trabajo es la FTIR, la cual identifica la presencia de grupos funcionales que existen en un compuesto basándose en la vibración molecular típica de los enlaces fundamentales que conforman dichos grupos.¹⁰² Estas vibraciones, se traducen en absorción de energía, por lo que se pueden discernir en un espectro de absorción.

Bajo el análisis de FTIR, los cCNTs utilizados en este estudio presentaron únicamente las bandas de absorción características del grafeno (benceno) que corresponden al estiramiento de los dobles enlaces carbono – carbono en resonancia, tales como se ha observado en otros trabajos al analizar CNTs prístinos.⁹⁸ Por otra parte, los oxCNTs – HA presentaron además de las bandas antes mencionadas, una banda amplia a 3300 cm^{-1} que corresponde al estiramiento oxígeno – hidrógeno del hidroxilo que forma parte del grupo carboxilo en la superficie.⁵⁰ Además, de manera importante, aparece una banda a 1702 cm^{-1} perteneciente al grupo carbonilo de la amida I, que se está formando por el enlace al HA,^{50,103} lo que confirma la presencia de este último en estos nanovectores.

Posteriormente, para determinar la cantidad de los componentes orgánicos de los nanovectores, se llevó a cabo el análisis termogravimétrico. Este análisis detecta los cambios del peso absoluto de un compuesto a medida que se corre un programa determinado de aplicación de calor.¹⁰⁴ Este método es altamente cuantitativo pero nada cualitativo, estos cambios de peso pueden deberse a descomposición o degradación de los componentes de la molécula, por esto resulta vital conocer la conformación del compuesto, lo que se puede obtener mediante técnicas espectroscópicas, como lo hemos realizado en este estudio.

Los primeros CNTs en analizarse fueron los cCNTs, los cuales mostraron una pérdida de peso muy baja, pues solo se observó la degradación por encima de los 400°C que pertenece a la estructura grafénica o el “esqueleto” de los CNTs, este mismo patrón de descomposición se

observa cuando se analizan CNTs de pristino.⁶⁵ Posteriormente, los oxCNTs mostraron una descomposición más pronunciada antes del punto de inflexión de la descomposición grafénica. Esta pérdida acelerada de peso es común en los CNTs que han pasado por un proceso de oxidación.⁵⁸ Sin embargo, esta disminución fue solo del 3%, mientras que en otros trabajos se han logrado oxidaciones hasta del 12%,⁸⁶ esto se debe principalmente a que los CNTs que utilizamos son muy resistentes a procesos oxidativos porque están grafitizados, es decir, tratados a altas temperaturas para eliminar defectos estructurales en el grafeno y reducir la presencia de metales pesados (Hierro, Cobalto) derivados de la síntesis.¹⁰⁵ Además, existen también diferencias en el proceso de la oxidación, por ejemplo, se ha observado que el aumento de la temperatura de la reacción por encima de los 100°C incrementa el rendimiento oxidativo en gran medida,^{53,86} la oxidación que realizamos se llevó a cabo a 60°C.

En cambio, los oxCNTs – HA mostraron un perfil de descomposición térmica muy distinto, se observó una pérdida de peso de un 10% del peso inicial antes del punto de inflexión de la descomposición grafénica. Como estos nanovectores también se encuentran oxidados, es necesario reducir ese porcentaje para obtener la cantidad del HA, que sería aproximadamente de un 7% del peso total del compuesto. La cantidad de HA en los oxCNTs – HA fue ligeramente menor en comparación con otros informes, esto puede deberse a diferencias en el proceso de funcionalización, otros estudios informan el uso de 2'2 (etilendioxi) bis (etilen amina) ⁴⁹ o agregar un paso de acilación antes de la aminación para obtener mayores rendimientos de reacción.⁵⁰

La última de las técnicas de caracterización que utilizamos fue la prueba del índice de hidrofobicidad. Este ensayo se basa en la naturaleza polar de los distintos nanovectores y como esa polaridad influye en su solubilidad en medios acuosos u oleosos.¹⁰⁶ En nuestro

trabajo, la hidrofobicidad de los cCNTs y de los oxCNTs los cuales resultaron ser completamente apolares, casi el 100% de ellos se solubilizaron preferentemente en el 1-octanol, un solvente bastante hidrófobo, un comportamiento que era esperado pues ambos tipos de CNTs presentan niveles bajos de grupos polares (-OH, -COOH) que puedan interactuar con las moléculas del agua.⁸⁶ En cambio, los oxCNTs – HA, presentaron una solubilidad compartida entre el agua y el 1 - octanol, por lo tanto un índice de hidrofobicidad menor, y esto se debe principalmente a la presencia de un polímero como el HA, que causa interacciones por medio de puentes de hidrógeno con el agua, así como estabilización electrostática entre sus mismas moléculas.^{86,87} De esta manera nosotros hemos demostrado la correcta funcionalización de nuestros nanovectores, los cuales cuentan con las características particulares necesarias para ser probados en ensayos en organismos biológicos para probar la eficacia con la que podrían acarrear fármacos platinados.

En nanomedicina, uno de los objetivos principales es eficientizar las terapias convencionales mediante el uso de nanovectores que se formulan para entregar fármacos de forma selectiva y reducir los efectos tóxicos de las terapias convencionales.⁶⁸ Para lograr esto, la formulación de un nanovector debe de ser intensivamente planeada, ejecutada y caracterizada, de tal forma que ejerza un efecto citotóxico potente en los tejidos afectados. De manera importante, debe garantizarse la bioseguridad del nanovector evaluándola tanto en sistemas biológicos controlados como en organismos completos, de tal forma que se asegure la biocompatibilidad e inocuidad en dichos entornos.¹⁰⁷

Es por esto, que en este trabajo evaluamos tanto en cultivos celulares, como en un modelo murino, la eficacia citotóxica y bioseguridad de los nanovectores creados.

Primeramente, fueron llevadas a cabo las evaluaciones de los nanovectores en cultivos celulares. Utilizamos dos líneas celulares murinas de distinto comportamiento, la línea celular tumoral TC – 1 y la línea celular no tumoral NIH / 3T3.

La primera línea, de características tumorales, fue creada por T.C. Wu, al transformar células epiteliales pulmonares murinas (C57/BL6J) con las proteínas E6/E7 del Virus del Papiloma Humano del genotipo 16 y activando el oncogén *ras* para inmortalizarlas.¹⁰⁸ Esta línea celular ha sido muy utilizada en estudios de terapias génicas antitumorales¹⁰⁹ o inclusive para evaluar el efecto antitumoral de toxinas aisladas de productos naturales.¹¹⁰ Una ventaja importante en el uso de estas células, es que al provenir de cultivos primarios de pulmones de ratones de la cepa C57/BL6J, dichas células pueden inocularse en estos ratones para formar tumores sin la necesidad de suprimir el sistema inmune del ratón sin que exista la posibilidad de rechazo tumoral.⁹² En este estudio, esta característica es importante, pues debido a esta compatibilidad, el efecto de fármaco o del nanovector con el fármaco puede ser medido sin algún tipo de interferencia o efecto adyuvante del sistema inmune.

Por otra parte, la línea celular no tumoral utilizada en nuestros análisis fue la NIH / 3T3, estas células también son de origen murino, son fibroblastos embrionarios bastante estables y se adhieren con facilidad a superficies, los que las hace candidatas especiales para estudios de nanomateriales diseñados para crear andamios o recubrimientos, por su alta capacidad adherente.¹¹¹ En este trabajo, tomamos ventaja de que esta línea no se encuentra transformada con genes oncogénicos, por lo que no expresa marcadores tumorales ni presenta alta proliferación por falta de regulación celular.

Para evaluar la citotoxicidad de los nanovectores y del CPT en cultivos celulares, utilizamos dos técnicas de análisis, el ensayo de MTT y el ensayo de tinción nuclear de DAPI.

El estudio de la viabilidad celular mediante la reducción del MTT históricamente ha sido utilizado para evaluar la citotoxicidad de los CNTs.^{112,113} Este ensayo se basa en la actividad de las oxido-reductasas mitocondriales para catalogar a las células como “viables” aquellas que reduzcan el MTT a formazán.¹¹⁴ Sin embargo, este mecanismo metabólico genera que el método sea susceptible a errores en situaciones de perturbación energética celular o por la capacidad reductora inherente del tratamiento,¹¹⁵ por lo que resulta importante utilizar otro método “no metabólico” que evalúe la viabilidad celular. Para resolver esta posibilidad, en nuestro estudio utilizamos el ensayo de tinción nuclear con DAPI, el cual utiliza una sonda fluorescente que se une al ADN de las células que se encuentran adheridas a la placa de cultiv.⁸⁸

En nuestros ensayos de citotoxicidad, ni las células NIH / 3T3 ni las TC – 1 mostraron valores elevados de muerte al ser tratadas con los cCNTs, lo cual posiblemente se debe a que los cCNTs se encuentran grafitizados, es decir, que se han tratado con calor y presiones elevadas, lo que reduce drásticamente el contenido de trazas de metales y aumenta su cristalización y su pureza,¹¹⁶ y que al mismo tiempo, se ha observado que reduce su toxicidad biológica *in vitro*.¹¹⁷

Al momento de tratar las células con CPt, tanto la línea no tumoral como la tumoral presentaron bajos niveles de citotoxicidad tras 24 h de incubación, y la línea no tumoral fue levemente más sensible a este fármaco. Otros estudios también muestran que el CPt por sí solo no afecta a las células TC – 1 de manera considerable.¹¹⁸ Mientras que, cuando se expusieron las células al tratamiento con los nanovectores cargados con CPt, se pudo observar un incremento en la citotoxicidad solamente en la línea celular tumoral. A la fecha, existen diversos estudios que muestran este efecto citotóxico potenciado del CPt debido a su

carga en sistemas de entrega de fármacos, por ejemplo, envuelto en liposomas contra células TC – 1¹¹⁹ o encapsulado en CNTs contra líneas tumorales uroteliales y renales¹²⁰ y contra líneas tumorales de cáncer de mama humano.¹²¹ Sin embargo, en ninguno de estos trabajos donde se emplea CPT, se han utilizado ni demostrado las ventajas de funcionalizar los CNTs con moléculas ligando como el HA para incrementar la especificidad del efecto citotóxico que se ha observado con otros fármacos antineoplásicos como la doxorubicina⁴⁹ o la gemcitabina,⁵⁰ y que posiblemente juega un papel importante en el aumento de la citotoxicidad de nuestro nanovector contra la línea tumoral en comparación con la no tumoral.

Además de la citotoxicidad, otro aspecto importante para evaluar en la seguridad de un nanovector es la capacidad de inducir estrés oxidativo, pues este efecto también genera alteraciones metabólicas y muerte celular.⁸⁹ En nuestro estudio, determinamos la inducción del estrés oxidativo mediante citometría de flujo utilizando la sonda DHE, un método bastante rápido y sensible.⁹⁰

Actualmente, se sabe que las ERO están fuertemente relacionadas con las mutaciones del ADN y la tumorigénesis,¹²² y que las células tumorales son deficientes en enzimas antioxidantes,¹²³ por lo que es esperable que las células TC-1 tengan niveles de estrés oxidativo más altos que los fibroblastos. Estudios muestran que los CNTs inducen estrés oxidativo *in vitro*.¹²⁴ Sin embargo, este efecto se anula cuando los CNTs se purifican mediante grafitización eliminando trazas de metales pesados utilizados en su síntesis como Hierro, Zinc o Cobalto.²⁹

En nuestro estudio, utilizamos CNTs altamente purificados (grafitizados) con cantidades muy bajas de Hierro (65 ppm) o Aluminio (10 ppm), por lo que cuando se incuban con las

células no causan un aumento en ERO, y solo un ligero aumento en el caso de oxCNTs – HA – CPt en células TC-1 y este efecto puede atribuirse al fármaco.¹²⁵ Por otro lado, observamos que los niveles de ERO de los fibroblastos se redujeron cuando se trataron con los CNTs, posiblemente porque los CNTs tienen una gran afinidad electrónica en sus orbitales moleculares de los átomos de carbono de sus paredes de grafeno, actuando como un eliminador de radicales libres,^{126,127} además, observamos que este efecto se ve reforzado por la adición de HA, ya que también tiene actividad antioxidante.¹²⁸ Por lo que se puede decir que la inducción del estrés oxidativo no juega un rol importante en la muerte celular producida por nuestro nanovector, y que en este ámbito, es altamente seguro para su aplicación en modelos biológicos.

Históricamente, se sabe que uno de los principales problemas de las terapias convencionales es la falta de especificidad que presentan los fármacos antineoplásicos, pues además de actuar pobremente sobre las células tumorales, muchas veces terminan provocando efectos tóxicos secundarios bastante serios.⁶⁸ En este sentido, un objetivo prioritario de la nanomedicina es el diseño de sistemas de entrega de fármacos que posean propiedades como incrementar la estabilidad, proteger el fármaco de la degradación, mejorar su distribución y especificidad hacia tejido tumoral y disminuir su toxicidad sistémica.¹⁷ Los CNTs poseen una estructura ideal para contener, estabilizar y proteger una gran cantidad de fármacos debido a su espacio interior.²⁸ Por otra parte, los CNTs tienen una gran versatilidad para unirse a moléculas que le provean de especificidad para direccionar las moléculas que se buscan entregar.⁴⁶ Para este fin, nuestro nanovector utiliza el concepto de la endocitosis mediada por receptores, la cual es una forma de transporte celular mediante el que una célula endocita material que contenga una molécula específica (ligando) que es detectada por una proteína en la membrana celular

(receptor), lo que detona una señal molecular para comenzar un proceso endocítico.²⁶ Diversos tipos de cáncer epitelial sobreexpresan el receptor del HA,⁴⁷ el cual interviene en funciones de adhesión celular, angiogénesis, activación de linfocitos, liberación de citocinas, así como proliferación, diferenciación y migración celular, características de gran importancia en el desarrollo tumoral y metástasis.⁹¹

Cómo ya se ha mencionado, en nuestro trabajo utilizamos dos líneas celulares, una tumoral y una de naturaleza no tumoral. Dichas células presentan características y orígenes distintos, por lo que sus perfiles metabólicos y de proteínas también son diferentes. Por esto, fue necesario identificar la presencia del receptor de HA (CD44) en ambas líneas, y después correlacionar dicha presencia o ausencia con la susceptibilidad para captar nanovectores acoplados al HA. Para analizar la presencia del CD44, utilizamos la técnica de inmunofluorescencia, la cual presenta una mejor sensibilidad y especificidad comparada contra la inmunohistoquímica convencional,¹²⁹ pues se vale del uso de anticuerpos altamente específicos conjugados con marcadores fluorescentes que son fáciles de detectar.

En nuestro estudio, no pudimos detectar la presencia del receptor CD44 en las células no tumorales (NIH – 3T3), En cambio, en las tumorales (TC – 1) la expresión fue bastante evidente. En consistencia con nuestro trabajo, otros estudios han utilizado métodos alternos como la citometría de flujo encontrando también una importante presencia del CD44 en las células TC – 1,¹³⁰ así como ausencia de dicho marcador en las células NIH – 3T3.¹³¹ Esto confirma que nuestra línea tumoral, expresa considerablemente el receptor de HA, lo que las hace teóricamente más aptas para internalizar al nanovector por el proceso de endocitosis mediada por receptores, incrementando directamente la selectividad en este tipo celular tumoral.

La endocitosis de los CNTs por parte de células es un proceso bastante complejo, pues depende de muchos factores como el tamaño de los CNTs, su funcionalización y su estado de agregación.¹³² Se ha observado que los CNTs con diámetros y longitudes más pequeños tienen procesos endocíticos más eficientes y rápidos,¹³³ mientras que, la funcionalización polimérica también ayuda en gran medida a ser captados, así como los CNTs que se encuentren en agregados más pequeños.¹³² Además, se ha observado que la endocitosis no es exclusiva de células de naturaleza fagocítica,⁵⁸ y que la principal vía involucrada es la endocitosis mediada por clatrin, mientras que la endocitosis por caveolinas y la macropinocitosis tienen un papel secundario.¹³⁴

En nuestro trabajo, evaluamos la endocitosis de los CNTs mediante microscopía de luz en cortes semifinos. La naturaleza grafénica de los CNTs hacen que este estudio sea posible, debido a que su color negro persiste a todos los tratamientos a los que se someten las células para su análisis. Además, el grosor que se maneja en los cortes semifinos (500 nm) permite observar perfectamente el interior del citoplasma, dejando al descubierto las vesículas endocíticas con CNTs que se formaron.

En nuestro análisis, cuando las líneas celulares fueron expuestas a los cCNTs, ambas mostraron un nivel similar de vesículas endocíticas, y éstas tenían gran tamaño, con aglomerados muy grandes y de aspecto muy denso. Dichas características de las vesículas coinciden con la naturaleza de los cCNTs, pues aunado a que presentan poca carboxilación, su longitud y diámetro provocan la formación de agregados de mayor tamaño.¹⁰⁶ En cambio, cuando las células fueron tratados con el nanovector acoplado a HA y a CPt, se presentaron vesículas de menor tamaño, con menos cantidad de CNTs en cada una y mayor cantidad de vesículas en las células tumorales en comparación con las no tumorales. Esto pudo ser

provocado por distintos factores, primeramente, la carboxilación de los CNTs y el acoplamiento a HA formaron CNTs mucho más solubles y con ello, mejor dispersión y aglomerados más pequeños, lo que favorece la captación celular y coincide con la apariencia de las vesículas,^{86,87} y segundo, el efecto de endocitosis mediada por receptores, aumentó la cantidad de vesículas presentes en las células tumorales, al formarse interacciones ligando – receptor.⁴⁸ Este aumento observado en la endocitosis de las células tumorales tratadas con el nanovector corresponde también con el efecto citotóxico potenciado mostrado por dichas células, por lo que el número de vesículas endocíticas se relaciona positivamente con la citotoxicidad. Este aumento vesicular no se observó en las células no tumorales, evitando así mayor daño citotóxico e incrementando su supervivencia.

Los CNTs se pueden internalizar mediante distintas vías como la endocitosis y la translocación directa al citoplasma, las cuales se rigen estrictamente por las características fisicoquímicas de los CNTs y del tipo celular involucrado.¹³² Como nuestras células no son de naturaleza fagocítica sino epitelial (TC – 1) y fibroblasto (NIH / 3T3), las vías pueden ser la endocítica y la translocación, las cuales se diferencian principalmente en que en la endocitosis, se forma una vesícula con una doble membrana que seguirá la vía endosomal – lisosomal, mientras que en la translocación dicho compartimento no existe, dejando a los CNTs libres en el citoplasma, estos fenómenos pueden ser detectados y diferenciados mediante TEM.¹³⁵

En nuestro estudio, fuimos capaces de observar la presencia e inclusive la formación de las vesículas endocíticas en las células tumorales TC – 1 al ser expuestas a los cCNTs, dichas vesículas presentaban una doble membrana plasmática muy bien definida y eran de gran tamaño, con mucho contenido de CNTs en su interior y en poca cantidad, esto se debe a la

naturaleza hidrofóbica de los cCNTs que causa que se compacten y aglomeren en medios acuosos.¹⁰⁶ En cambio, cuando se incubaron con los nanovectores acoplados a HA y CPT, notamos un aumento significativo del número de vesículas, además dichas vesículas contenían menor cantidad de CNTs, lo que se traduce en un efecto citotóxico más eficiente,¹²¹ causado por la funcionalización de los CNTs que genera mejor dispersabilidad en medios acuosos.⁸⁶ Mediante esta evidencia se puede comprobar que la funcionalización de los CNTs incrementa la capacidad de los nanovectores para ser endocitados y no translocados en las células tumorales.

Cuando se realiza la evaluación de un sistema de entrega de fármacos, se deben cubrir aspectos como su diseño y caracterización fisicoquímica, solubilidad, dispersión y estabilidad en medios acuosos, así como ensayos en modelos biológicos *in vitro*, y por último, en modelos biológicos *in vivo*, utilizando primeramente mamíferos inferiores, como los roedores.

El uso de modelos murinos en nanomedicina es de vital importancia, pues estos reproducen de manera similar las condiciones fisicoquímicas y biológicas que pueden dictar el comportamiento, efectos y riesgos de la aplicación de los nanovectores en organismos más complejos como los humanos.¹⁰⁷

Como antes se ha descrito, utilizamos un modelo murino de cáncer que ha sido ampliamente reproducido en nuestro laboratorio para evaluar el efecto antitumoral de terapias génicas¹⁰⁹ o de extractos naturales,¹¹⁰ haciendo uso de las propiedades biológicas de las células TC – 1 para generar tumores en ratones de la cepa C57/BL6J sin necesidad de inmunosuprimir. Con este modelo, existen dos tipos de generación de tumores, el primero es inyectando las células tumorales por vía intravenosa estableciendo focos tumorales en el parénquima pulmonar, lo

que simula un modelo de cáncer metastásico,⁹² y el segundo, que es mediante la inyección de las células tumorales en el espacio subcutáneo, generando un tumor localizado,¹⁰⁹ lo que facilita su detección, manejo y monitoreo, por estos motivos decidimos usar el modelo subcutáneo.

En este estudio, el modelo murino de cáncer fue empleado para conocer tanto el efecto antitumoral como la bioseguridad que presenta nuestro nanovector al momento de administrarlo por vía intratumoral y comparar estos parámetros contra la terapia convencional de CPT y los cCNTs.

Uno de los parámetros para conocer el estado general de salud de los ratones fue evaluar su peso corporal, pues es bien conocido que a medida que el cáncer avanza, aparecen complicaciones graves derivadas del tumor entre ellas el dolor, la fatiga crónica y la anorexia, lo que provoca una pérdida de peso corporal notable.¹³⁶ En nuestro trabajo, únicamente a los ratones del grupo al que se les administró el vehículo, es decir, PBS, fueron los que registraron pérdida de peso significativa, mientras que todos los demás grupos se mantuvieron bastante estables en su peso corporal. Esto era de esperarse, pues el PBS no actúa de ninguna manera para contrarrestar los efectos perjudiciales causados por el tumor, en cambio, en los otros grupos si se administraron compuestos que previamente mostraron efectos citotóxicos *in vitro* contra las células TC – 1 en mayor o menor medida, ya sea CPT, cCNTs, oxCNTs – HA o oxCNTs – HA – CPT.

Por otra parte, también se investigó el volumen (expresado en peso) de los tumores extirpados de los ratones para correlacionarlo con el efecto antitumoral que tuvieron los distintos tratamientos administrados.⁴⁵ En este ámbito, no pudimos observar diferencias significativas entre los grupos estudiados, solamente se notaba una leve tendencia a la baja en el peso

tumoral del grupo de ratones tratados con el nanovector final, pero la dispersión entre los tumores fue muy grande para establecer una diferencia concreta. Esto pudo ser causado por distintas situaciones, primeramente, la dispersión en los tamaños pudo deberse a la heterogeneidad en el número de células o diferencias en la viabilidad de células inyectadas al momento de inocular el tumor, esto puede resolverse mediante la medición de los volúmenes tumorales en lugar del peso, y hacer una relación entre el volumen inicial y el volumen final de cada ratón en cada uno de los grupos.¹⁰¹ Por otra parte, el efecto antitumoral leve también puede ser debido a que se administró ya en una fase muy avanzada del tumor, en la cual ya no es capaz de contrarrestar el crecimiento tumoral, pues las células tumorales han incrementado la expresión de proteínas activadoras de la proliferación celular, incrementando su resistencia al efecto citotóxico del fármaco,¹³⁷ este efecto puede revertirse administrando los tratamiento más tempranamente. Aunque observamos una tendencia a la baja en el crecimiento tumoral del grupo tratado con el nanovector, esta reducción no es suficiente para establecer un efecto terapéutico, por lo que se deben de realizar más ensayos para observar con mayor grado de certeza el efecto antitumoral de nuestro nanovector.

Para analizar de una forma integral las interacciones entre los nanovectores con el tejido tumoral, realizamos los análisis histopatológicos de los tumores mediante microscopía de luz. La diferencia principal observada entre los distintos tratamientos donde se administraron CNTs (cCNTs, oxCNTs – HA, oxCNTs – HA – CPt) fue su presencia y dispersión. En el grupo administrado con el tratamiento del nanovector acoplado a HA y cargado con CPt fue donde se observó mayor presencia, aglomerados más pequeños, mejor dispersión e inclusive una evidente asociación con las estructuras vasculares. Estos hallazgos

resultan concordantes con los resultados obtenidos *in vitro* y son causados por la naturaleza hidrofílica del nanovector que se deriva de su funcionalización.¹³⁸

Además de los tumores, se investigaron otros órganos vitales con la intención de evaluar la bioseguridad terapéutica de los nanovectores administrados por la vía intratumoral. La importancia de estos análisis recae en demostrar que nuestros nanovectores presenten una baja toxicidad sistémica, es decir, que no provoquen alteraciones histológicas estructurales o inflamación en órganos que no sean el objetivo de la terapia.¹⁰¹ En nuestro trabajo, analizamos distintos órganos como el hígado, riñón, pulmón, corazón, cerebro y bazo, haciendo énfasis en los primeros tres, pues son importantes en el metabolismo de los fármacos platinados y del mantenimiento de la homeostasis corporal.

Primeramente analizamos el hígado, al ser el órgano más importante en el metabolismo de los fármacos platinados y por esto puede mostrar efectos causados por el CPt.¹³⁹ Durante los análisis de los hígados de los ratones tratados con CPt, pudimos observar un daño hepático primario que coincide con los signos de una esteatosis hepática causada por fármacos, que se caracteriza principalmente por la presencia abundante de vesículas en el parénquima hepático.¹⁴⁰ De forma interesante, los hígados del grupo de ratones tratados con los nanovectores acoplados a HA y cargados con CPt no presentaban este daño hepático, lo que puede ser causado por su actividad específica derivado de la funcionalización,⁴⁸ y además, por el efecto de retención y permeabilidad que existe en el microambiente tumoral, lo que incrementa el tiempo de residencia del nanovector liberando su contenido en el tejido tumoral e inhibiendo su acción en otros órganos.¹²⁰ Otra observación importante en nuestros análisis del hígado, es que no se encontraron rastros de CNTs en ninguno de los grupos de estudio, mientras que en otros estudios se ha visto que cuando se administran CNTs por vía

intravenosa estos tienden a acumularse en este órgano.¹⁴¹ Aunque dicha diferencia puede deberse al tipo de aplicación de los CNTs ya que en nuestro caso, fueron administrados por vía intratumoral, lo que reduce la probabilidad de una alta perfusión sistémica.

Por otra parte, también se analizó el riñón en el modelo murino, debido a que este órgano lleva a cabo funciones muy importantes de filtración de la sangre, por lo que está expuesto a metabolitos secundarios de fármacos, aunque se ha observado que en el caso particular del CPt no presenta un perfil nefrotóxico importante.¹⁴² Además, existen múltiples reportes que este órgano participa en gran medida para la eliminación de los CNTs en circulación sanguínea, siendo dicha eliminación más eficiente cuando los CNTs se encuentran funcionalizados.¹⁴³ En general, estudios toxicológicos muestran que la administración intravenosa de CNTs no causa daños tisulares importantes en el parénquima renal,¹⁰⁰ esto fue concordante con nuestros resultados pues en ninguno de los grupos de estudio se encontraron alteraciones histológicas ni inflamación.

Los pulmones también son un órgano que particularmente es de interés en nuestro modelo, pues se ha observado en otros modelos *in vivo* utilizando CNTs, que este órgano tiene las características anatómicas especiales que pueden provocar retención de los CNTs cuando estos se administran por vía intravenosa.^{49,80} Al analizar los pulmones del grupo de cCNTs, encontramos presencia muy escasa de nanovectores, muy compactos y densos, principalmente en el área capilar, pero sin obstruir en el espacio aéreo. Esta presencia de CNTs incrementó en el grupo de los oxCNTs – HA – CPt, los cuales, debido a su funcionalización hidrofílica, son más hidrosolubles y su capacidad de viajar por torrente sanguíneo es más elevada.¹⁴⁴ De manera positiva, no encontramos que la presencia de los nanovectores en el parénquima pulmonar causara efectos perjudiciales como inflamación o

edema. En otros estudios también se ha observado la retención pulmonar de los CNTs sin que llegue a causar efectos inflamatorios en lapsos tanto de 24 h,¹⁰⁰ como hasta de 28 días, donde se ha observado que en CNTs funcionalizados, la presencia de estos se reduce a niveles indetectables en cuestión de días.¹⁴⁵

El bazo es otro órgano donde se ha reportado la acumulación de CNTs administrados intravenosamente, sobre todo cuando estos no se encuentran funcionalizados.¹⁴¹ En nuestro caso, no pudimos detectar la presencia de nanovectores en ninguno de los grupos de estudio, esto puede ser debido a que éstos fueron inyectados intratumoralmente, lo que impide que los nanovectores entren a circulación sanguínea en gran medida. Y por último, en otros órganos como corazón o cerebro tampoco observamos la presencia de nanovectores ni de alteraciones estructurales, pues los CNTs no tienen la capacidad de retenerse en tejido cardíaco,¹⁴⁵ y si bien, existen reportes de que los CNTs son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica cuando se encuentran propiamente funcionalizados,¹⁴⁶ en nuestro caso, es poco probable encontrarlos a causa de la administración intratumoral.

En resumen, podemos señalar que encontramos que los nanovectores funcionalizados con HA y cargados con CPt poseen una actividad citotóxica específica contra células tumorales, reduciendo el daño causado a las células de naturaleza no tumoral. Además, se comprobó que la internalización de estos nanovectores fue mayor en las células tumorales, lo que se correlaciona con su efecto citotóxico, y que esta internalización es llevada cabo mediante endocitosis mediada por receptores. Por último, demostramos la bioseguridad que poseen los nanovectores en un modelo *in vivo*, al probar que la administración intratumoral de estos, no afecta de manera significativa otros órganos vitales, ni causa inflamación, ni falla en las funciones de dichos órganos. En conjunto, toda esta evidencia sostiene que los CNTs

funcionalizados con HA y cargados con CPt diseñados y generados en este estudio, son una opción terapéutica eficaz y segura para este modelo de cáncer murino.

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

Primera: Se logró construir y caracterizar el nanovector compuesto de CNTs, demostrando su oxidación, su funcionalización con HA y la internalización del CPT.

Segunda: El nanovector acoplado a HA y cargado con CPT resultó ser más citotóxico que el CPT para las células tumorales en comparación con las células no tumorales y esta toxicidad es dependiente de la dosis.

Tercera: Las pruebas de selectividad demostraron que el nanovector que presenta la funcionalización con HA tiene mayor capacidad para internalizarse en células tumorales que en las no tumorales, esto debido a la alta expresión del CD44 en la línea tumoral.

Cuarta: El modelo *in vivo* demuestra la buena retención intratumoral que presenta el nanovector completo, en comparación con los nanovectores que no están funcionalizados. Además, reduce drásticamente el daño hepático causado por el fármaco convencional y su administración intratumoral no afecta otros órganos vitales.

PERSPECTIVAS

10. PERSPECTIVAS

En este trabajo, se investigó la eficacia y seguridad que posee un nanovector construido a partir de CNTs para entregar CPt en un modelo murino de cáncer.

Diseñamos, desarrollamos y caracterizamos el nanovector y pudimos observar efectos positivos en cuestiones de citotoxicidad específica y bioseguridad en el modelo *in vitro*, así mismo, la bioseguridad del nanovector en nuestro modelo *in vivo* resultó ser adecuada, reduciendo signos de toxicidad sistémica. Sin embargo, en este último modelo no pudimos obtener resultados contundentes sobre el efecto antineoplásico.

Por otra parte, durante el desarrollo del proyecto nos encontramos con distintas dificultades y surgieron nuevos cuestionamientos en la generación y aplicación del nanovector. En este sentido, nos hemos planteado una serie de mejoras y procedimientos que se pueden implementar con la finalidad de incrementar los efectos citotóxicos contra células tumorales, obtener un efecto antitumoral con un mayor número de evidencias en el modelo *in vivo* y conocer con mayor certeza los mecanismos involucrados en dichos efectos.

Primera: Oxidar los CNTs a una temperatura superior a los 100°C, para eficientizar la carboxilación de la superficie, teniendo mayor cantidad de grupos que se puedan funcionalizar.

Segunda: Probar otros fármacos antineoplásicos ya sean platinados como el cisplatino, o no platinados como la doxorrubicina o el paclitaxel, para encontrar mayor susceptibilidad por parte de la línea celular TC – 1 y medir cuantitativamente la carga de estos fármacos mediante espectrometría de absorción atómica.

Tercera: Probar el efecto citotóxico *in vitro* con variaciones en los tiempos de incubación (12, 48 y 72 h) para averiguar si el nanovector posee efecto de liberación prolongada y protección del fármaco a la degradación prematura.

Cuarta: Investigar la presencia de proteínas pro-apoptóticas o de las vías de necrosis y autofagia, para elucidar los mecanismos de muerte involucrados en el proceso citotóxico potenciado causado por el nanovector.

Quinta: Implementar una construcción de CNTs funcionalizados con Isotiocianato de Fluoresceína (FTIC), que puedan emitir fluorescencia y ser detectados mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo, para incrementar la capacidad de cuantificación en la internalización.

Sexta: Reproducir el modelo murino de cáncer con las células TC – 1 implantadas subcutáneamente, mejorar el proceso de la implantación para no tener tanta variación en los tamaños del tumor y administrar los tratamientos más tempranamente tanto por la vía intratumoral como por la vía intravenosa para observar las ventajas/desventajas de esto, y para observar efectos terapéuticos más significativos y representativos.

Séptima: Desarrollar el modelo murino de cáncer con las células TC – 1 administradas de forma intravenosa simulando un cáncer cervical metastásico. Así mismo, inyectar de forma intravenosa el tratamiento y observar las diferencias en la biodistribución, efecto antitumoral y bioseguridad del nanovector.

BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Published 2020. Accessed April 6, 2020.
2. GLOBOCAN. Cancer Today. <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>. Published 2020.
3. Toyokuni S. Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes ☆. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(15):2098-2110. doi:10.1016/j.addr.2013.05.011
4. Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther.* 2009;1(2):1-4. doi:10.4172/1948-5956.100000e2.History
5. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(4):271-289. doi:10.3322/caac.21349
6. Yabroff KR, Lamont EB, Mariotto A, et al. Cost of care for elderly cancer patients in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(9):630-641. doi:10.1093/jnci/djn103
7. Gottschalk A, Ford JG, Regelin CC, et al. Association between epidural analgesia and cancer recurrence after colorectal cancer surgery. *Anesthesiology.* 2010;113(1):27-34. doi:10.1097/ALN.0b013e3181de6d0d
8. Wyld L, Audisio RA, Poston GJ. The evolution of cancer surgery and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12(2):115-124. doi:10.1038/nrclinonc.2014.191
9. Citrin DE. Recent developments in radiotherapy. *N Engl J Med.* 2017;377(11):1065-1075. doi:10.1056/NEJMr1608986

10. Allen C, Her S, Jaffray DA. Radiotherapy for Cancer: Present and Future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;109:1-2. doi:10.1016/j.addr.2017.01.004
11. Gegechkori N, Haines L, Lin JJ. Long-Term and Latent Side Effects of Specific Cancer Types. *Med Clin North Am.* 2017;101(6):1053-1073. doi:10.1016/j.mcna.2017.06.003
12. DeVita VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 2008;68(21):8643-8653. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6611
13. Mehrling T. Chemotherapy is getting “smarter.” *Futur Oncol.* 2015;11(4):549-552. doi:10.2217/fon.14.248
14. Livshits Z, Rao RB, Smith SW. An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emerg Med Clin North Am.* 2014;32(1):167-203. doi:10.1016/j.emc.2013.09.002
15. Baldo BA, Pham NH. Adverse reactions to targeted and non-targeted chemotherapeutic drugs with emphasis on hypersensitivity responses and the invasive metastatic switch. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(3-4):723-761. doi:10.1007/s10555-013-9447-3
16. Young JS, Simmons JW. Chemotherapeutic medications and their emergent complications. *Emerg Med Clin North Am.* 2014;32(3):563-578. doi:10.1016/j.emc.2014.04.006
17. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release.* 2015;200:138-157. doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.030

18. Hussain S. Nanomedicine for Treatment of Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2016;890:137-147. doi:10.1007/978-3-319-24932-2
19. Wu W, Liu P, Li J. Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;82(3):249-258. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.08.004
20. Heister E, Brunner EW, Dieckmann GR, Jurewicz I, Dalton AB. Are carbon nanotubes a natural solution? applications in biology and medicine. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5(6):1870-1891. doi:10.1021/am302902d
21. Han G, Martin CT, Rotello VM. Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents. *Chem Biol Drug Des.* 2006;67(1):78-82. doi:10.1111/j.1747-0285.2005.00324.x
22. Hong R, Han G, Fernández JM, Kim BJ, Forbes NS, Rotello VM. Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J Am Chem Soc.* 2006;128(4):1078-1079. doi:10.1021/ja056726i
23. You C, Han C, Wang X, et al. The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity. *Mol Biol Rep.* 2012;39(9):9193-9201. doi:10.1007/s11033-012-1792-8
24. Al-Qadi S, Remuñán-López C. Nanopartículas metálicas: oro. *Nanotecnología Farm.* 2009:223-248.
25. Bhattacharya K, Andón FT, El-Sayed R, Fadeel B. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on pulmonary inflammation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(15):2087-2097. doi:10.1016/j.addr.2013.05.012

26. Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(1):20-37. doi:10.1038/nrc.2016.108
27. Salas-Trevino D, Saucedo-Cardenas O, Loera-Arias MDJ, et al. Carbon nanotubes: An alternative for platinum-based drugs delivery systems. *J BUON*. 2018;23(3):541-549.
28. Martincic M, Tobias G. Filled carbon nanotubes in biomedical imaging and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;12(5):563-581. doi:10.1517/17425247.2015.971751
29. Tsukahara T, Haniu H. Cellular cytotoxic response induced by highly purified multi-wall carbon nanotube in human lung cells. *Mol Cell Biochem*. 2011;352(1-2):57-63. doi:10.1007/s11010-011-0739-z
30. Lanone S, Andujar P, Kermanizadeh A, Boczkowski J. Determinants of carbon nanotube toxicity. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(15):2063-2069. doi:10.1016/j.addr.2013.07.019
31. Maruyama K, Haniu H, Saito N, et al. Endocytosis of Multiwalled Carbon Nanotubes in Bronchial Epithelial and Mesothelial Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:793186. doi:10.1155/2015/793186
32. Sanginario A, Miccoli B, Demarchi D. Carbon Nanotubes as an Effective Opportunity for Cancer Diagnosis and Treatment. *Biosensors*. 2017;7(1):9. doi:10.3390/bios7010009
33. Imran M, Jamshaid U, Jamshaid T, Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Carbon nanotubes

- from synthesis to in vivo biomedical applications. *Int J Pharm.* 2016;501(1-2):278-299. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.01.064
34. Tsukahara T, Matsuda Y, Haniu H. The Role of Autophagy as a Mechanism of Toxicity Induced by Multi-Walled Carbon Nanotubes in Human Lung Cells. *Int J Mol Sci.* 2015;16:40-48. doi:10.3390/ijms16010040
 35. Goornavar V, Biradar S, Ezeagwu C, Ezeagwu D, Hall JC, Ramesh GT. Toxicity of Raw and Purified Single-Walled Carbon Nanotubes in Rat ' s Lung Epithelial and Cervical Cancer Cells. *J Nanosci Nanotechnology.* 2015;15:2105-2114. doi:10.1166/jnn.2015.9524
 36. Poland CA, Duffin R, Kinloch I, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol.* 2008;3(7):423-428. doi:10.1038/nnano.2008.111
 37. Ali-Boucetta H, Kostarelos K. Pharmacology of carbon nanotubes: Toxicokinetics, excretion and tissue accumulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(15):2111-2119. doi:10.1016/j.addr.2013.10.004
 38. Ema M, Gamo M, Honda K. A review of toxicity studies of single-walled carbon nanotubes in laboratory animals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;74:42-63. doi:10.1016/j.yrtph.2015.11.015
 39. Jain KK. Advances in use of functionalized carbon nanotubes for drug design and discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2012;1-9. doi:10.1517/17460441.2012.722078
 40. Wei Q, Zhan L, Juanjuan B, et al. Biodistribution of co-exposure to multi-walled carbon nanotubes and nanodiamonds in mice. *Nanoscale Res Lett.* 2012;7(1):473.

doi:10.1186/1556-276X-7-473

41. Vardharajula S, Ali SZ, Tiwari PM, et al. Functionalized carbon nanotubes: Biomedical applications. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:5361-5374. doi:10.2147/IJN.S35832
42. Gomez-Gualdrón DA, Burgos JC, Yu J, Balbuena PB. *Carbon Nanotubes: Engineering Biomedical Applications*. Vol 104.; 2011. doi:10.1016/B978-0-12-416020-0.00005-X
43. Arlt M, Haase D, Hampel S, et al. Delivery of carboplatin by carbon-based nanocontainers mediates increased cancer cell death. *Nanotechnology*. 2010;21(33):335101. doi:10.1088/0957-4484/21/33/335101
44. Bhirde AA, Patel S, Sousa AA, et al. Distribution and clearance of PEG-single-walled carbon nanotube cancer drug delivery vehicles in mice. *Nanomedicine*. 2010;5(10):1535-1546. doi:10.2217/nnm.10.90
45. Bhirde AA, Patel V, Gavard J, et al. Targeted Killing of Cancer Cells *in Vivo* and *in Vitro* with EGF-Directed Carbon Nanotube-Based Drug Delivery. *ACS Nano*. 2009;3(2):307-316. doi:10.1021/nm800551s
46. Adeli M, Soleyman R, Beiranvand Z, Madani F. Carbon nanotubes in cancer therapy: a more precise look at the role of carbon nanotube-polymer interactions. *Chem Soc Rev*. 2013;42(12):5231-5256. doi:10.1039/c3cs35431h
47. Jaracz S, Chen J, Kuznetsova L V., Ojima I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorganic Med Chem*. 2005;13(17):5043-5054. doi:10.1016/j.bmc.2005.04.084

48. Cao X, Tao L, Wen S, Hou W, Shi X. Hyaluronic acid-modified multiwalled carbon nanotubes for targeted delivery of doxorubicin into cancer cells. *Carbohydr Res.* 2015;405:70-77. doi:10.1016/j.carres.2014.06.030
49. Datir SR, Das M, Singh RP, Jain S. Hyaluronate tethered, “smart” multiwalled carbon nanotubes for tumor-targeted delivery of doxorubicin. *Bioconjug Chem.* 2012;23(11):2201-2213. doi:10.1021/bc300248t
50. Prajapati SK, Jain A, Shrivastava C, Jain AK. Hyaluronic acid conjugated multi-walled carbon nanotubes for colon cancer targeting. *Int J Biol Macromol.* 2019;123:691-703. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.116
51. Guven A, Villares GJ, Hilsenbeck SG, et al. Carbon nanotube capsules enhance the in vivo efficacy of cisplatin. *Acta Biomater.* 2017;58:466-478. doi:10.1016/j.actbio.2017.04.035
52. Li R, Wu R, Zhao L, et al. Folate and iron difunctionalized multiwall carbon nanotubes as dual-targeted drug nanocarrier to cancer cells. *Carbon N Y.* 2011;49(5):1797-1805. doi:10.1016/j.carbon.2011.01.003
53. Sui L, Yang T, Gao P, et al. Incorporation of cisplatin into PEG-wrapped ultrapurified large-inner-diameter MWCNTs for enhanced loading efficiency and release profile. *Int J Pharm.* 2014;471(1-2):157-165. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.05.022
54. Florea A-M, Büsselberg D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers (Basel).* 2011;3:1351-1371. doi:10.3390/cancers3011351
55. Dilruba S, Kalayda G V. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer*

- Chemother Pharmacol.* 2016;77(6):1103-1124. doi:10.1007/s00280-016-2976-z
56. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, et al. CONCURRENT CISPLATIN-BASED RADIOTHERAPY AND CHEMOTHERAPY FOR LOCALLY ADVANCED CERVICAL CANCER. *N Engl J Med.* 1999;340:1144-1153.
 57. Li J, Yap SQ, Chin CF, et al. Platinum(iv) prodrugs entrapped within multiwalled carbon nanotubes: Selective release by chemical reduction and hydrophobicity reversal. *Chem Sci.* 2012;3(6):2083. doi:10.1039/c2sc01086k
 58. Muzi L, Ménard-Moyon C, Russier J, et al. Diameter-dependent release of a cisplatin pro-drug from small and large functionalized carbon nanotubes. *Nanoscale.* 2015;7(12):5383-5394. doi:10.1039/C5NR00220F
 59. Castria T, Da Silva E, Gois A, Riera R. Cisplatin versus carboplatin in combination with third- generation drugs for advanced non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(8). doi:10.1002/14651858.CD009256.pub2.www.cochranelibrary.com
 60. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy : Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
 61. Lorusso D, Petrelli F, Coinu A, Raspagliesi F, Barni S. A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2014;133(1):117-123. doi:10.1016/j.ygyno.2014.01.042
 62. Lin T, Rodriguez CO, Li Y. Nanomedicine in veterinary oncology. *Vet J.* 2015;205(2):189-197. doi:10.1016/j.tvjl.2015.02.015

63. Hosni Z, Bessrouer R, Tangour B. ¹⁹⁵Pt chemical shift ability to control the antitumor drug cisplatin encapsulated into carbon nanotubes: A theoretical study. *J Comput Theor Nanosci.* 2014;11(2):318-323. doi:10.1166/jctn.2014.3354
64. Mejri A, Vardanega D, Tangour B, Gharbi T, Picaud F. Encapsulation into carbon nanotubes and release of anticancer cisplatin drug molecule. *J Phys Chem B.* 2015;119(2):604-611. doi:10.1021/jp5102384
65. Li J, Yap SQ, Yoong SL, et al. Carbon nanotube bottles for incorporation, release and enhanced cytotoxic effect of cisplatin. *Carbon N Y.* 2012;50(4):1625-1634. doi:10.1016/j.carbon.2011.11.043
66. Hampel S, Kunze D, Haase D, et al. Carbon nanotubes filled with a chemotherapeutic agent: a nanocarrier mediates inhibition of tumor cell growth. *Nanomedicine (Lond).* 2008;3(2):175-182. doi:10.2217/17435889.3.2.175
67. Lila ASA, Kiwada H, Ishida T. Selective delivery of oxaliplatin to tumor tissue by nanocarrier system enhances overall therapeutic efficacy of the encapsulated oxaliplatin. *Biol Pharm Bull.* 2014;37(2):206-211. doi:10.1248/bpb.b13-00540
68. Imran M, Jamshaid U, Jamshaid T, Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications. *Int J Pharm.* 2016;501:278-299.
69. Yoong SL, Wong BS, Zhou QL, et al. Enhanced cytotoxicity to cancer cells by mitochondria-targeting MWCNTs containing platinum(IV) prodrug of cisplatin. *Biomaterials.* 2014;35(2):748-759. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.036
70. Donaldson K, Poland CA, Murphy FA, MacFarlane M, Chernova T, Schinwald A. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos - Similarities and differences.

- Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(15):2078-2086. doi:10.1016/j.addr.2013.07.014
71. Guven A, Rusakova IA, Lewis MT, Wilson LJ. Cisplatin@US-tube carbon nanocapsules for enhanced chemotherapeutic delivery. *Biomaterials.* 2012;33(5):1455-1461. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.060
 72. Raoof M, Cisneros BT, Guven A, et al. Remotely triggered cisplatin release from carbon nanocapsules by radiofrequency fields. *Biomaterials.* 2013;34(7):1862-1869. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.11.033
 73. Wu L, Man C, Wang H, et al. PEGylated multi-walled carbon nanotubes for encapsulation and sustained release of oxaliplatin. *Pharm Res.* 2013;30(2):412-423. doi:10.1007/s11095-012-0883-5
 74. Dhar S, Liu Z, Thomale J, Dai H, Lippard SJ. Targeted Single-Wall Carbon Nanotube-Mediated Pt (IV) Prodrug Delivery Using Folate as a Homing Device Targeted Single-Wall Carbon Nanotube-Mediated Pt (IV) Prodrug Delivery Using Folate as a Homing Device. *J Am Chem Soc.* 2008;130:11467-11476. doi:10.1021/ja803036e
 75. Feazell RP, Nakayama-Ratchford N, Dai H, Lippard SJ. Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum(IV) anticancer drug design. *J Am Chem Soc.* 2007;129(27):8438-8439. doi:10.1021/ja073231f
 76. Bhirde AA, Sousa AA, Patel V, et al. Imaging the distribution of individual platinum-based anticancer drug molecules attached to single-wall carbon nanotubes. *Nanomedicine (Lond).* 2009;4(7):763-772. doi:10.2217/nmm.09.56
 77. Li J, Yoong SL, Goh WJ, et al. In vitro controlled release of cisplatin from gold-carbon nanobottles via cleavable linkages. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:7425-7441.

doi:10.2147/IJN.S93810

78. Ajima K, Yudasaka M, Murakami T, Maigné A, Shiba K, Iijima S. Carbon nanohorns as anticancer drug carriers. *Mol Pharm.* 2005;2(6):475-480. doi:10.1021/mp0500566
79. Ringel J, Erdmann K, Hampel S, et al. Carbon nanofibers and carbon nanotubes sensitize prostate and bladder cancer cells to platinum-based chemotherapeutics. *J Biomed Nanotechnol.* 2014;10(3):463-477. doi:10.1166/jbn.2014.1758
80. Li J, Pant A, Chin CF, et al. In vivo biodistribution of platinum-based drugs encapsulated into multi-walled carbon nanotubes. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2014;10(7):1465-1475. doi:10.1016/j.nano.2014.01.004
81. Balas M, Constanda S, Duma-Voiculet A, et al. Fabrication and toxicity characterization of a hybrid material based on oxidized and aminated MWCNT loaded with carboplatin. *Toxicol Vit.* 2016;37:189-200. doi:10.1016/j.tiv.2016.09.011
82. Haase D, Hampel S, Kraemer K, et al. Carbon Nanotubes Filled with Carboplatin: Towards Carbon Nanotube-Supported Delivery of Chemotherapeutic Agents. *Carbon Nanostructures.* 2011;3(115):642-651. doi:10.1007/978-3-642-14802-6
83. Irannejad S, Amini M, Modanlookordi M, Shokrzadeh M, Irannejad H. Preparation of diaminedicarboxyplatinum (II) functionalized single-wall carbon nanotube via Bingel reaction as a novel cytotoxic agent. *Iran J Pharm Res.* 2016;15(4):753-762.
84. Erdmann K, Ringel J, Hampel S, Rieger C, Huebner D, Wirth MP FS. Chemosensitizing effects of carbon-based nanomaterials in cancer cells: enhanced apoptosis and inhibition of proliferation as underlying mechanisms. *Nanotechnology.* 2014;25(40):405102. doi:10.1088/0957-4484/25/40/405102

85. Fahrenholtz CD, Ding S, Bernish BW, et al. Design and cellular studies of a carbon nanotube-based delivery system for a hybrid platinum-acridine anticancer agent. *J Inorg Biochem.* 2016;165:170-180. doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.07.016
86. Ntim SA, Sae-Khow O, Witzmann FA, Mitra S. Effects of polymer wrapping and covalent functionalization on the stability of MWCNT in aqueous dispersions. *J Colloid Interface Sci.* 2011;355(2):383-388. doi:10.1016/j.jcis.2010.12.052
87. Wang X, Xia T, Ntim SA, et al. Quantitative techniques for assessing and controlling the dispersion and biological effects of multiwalled carbon nanotubes in mammalian tissue culture cells. *ACS Nano.* 2010;4(12):7241-7252. doi:10.1021/nn102112b
88. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotech Histochem.* 1995;70(5):220-233. doi:10.3109/10520299509108199
89. Tsukahara T, Matsuda Y, Usui Y, Haniu H. Highly purified, multi-wall carbon nanotubes induce light-chain 3B expression in human lung cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;440(2):348-353. doi:10.1016/j.bbrc.2013.09.089
90. Ramirez-Moreno MJ, Duarte-Jurado AP, Gopar-Cuevas Y, et al. Autophagy Stimulation Decreases Dopaminergic Neuronal Death Mediated by Oxidative Stress. *Mol Neurobiol.* 2019. doi:10.1007/s12035-019-01654-1
91. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2002;39(6):527-579. doi:10.1080/10408360290795574
92. Ji H, Chang EY, Lin KY, Kurman RJ, Pardoll DM, Wu TC. Antigen-specific immunotherapy for murine lung metastatic tumors expressing human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Int J Cancer.* 1998;78(1):41-45.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9724092>.

93. Siddik ZH, Jones M, Boxall FE, Harrap KR. Comparative distribution and excretion of carboplatin and cisplatin in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1988;21(1):19-24. doi:10.1007/BF00262732
94. Venditto VJ, Szoka FC. Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs! *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):80-88. doi:10.1016/j.addr.2012.09.038
95. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
96. Rastogi V, Yadav P, Bhattacharya SS, et al. Carbon Nanotubes: An Emerging Drug Carrier for Targeting Cancer Cells. *J Drug Deliv*. 2014;2014:1-23. doi:10.1155/2014/670815
97. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel–Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(24):2542-2550. doi:10.1056/NEJMoa061884
98. Kumarathasan P, Breznan D, Das D, et al. Cytotoxicity of carbon nanotube variants: A comparative in vitro exposure study with A549 epithelial and J774 macrophage cells. *Nanotoxicology*. 2015;9(2):1743-5390. doi:10.3109/17435390.2014.902519
99. Ursini CL, Cavallo D, Fresegna AM, et al. Comparative cyto-genotoxicity assessment of functionalized and pristine multiwalled carbon nanotubes on human lung epithelial cells. *Toxicol Vitro*. 2012;26(6):831-840. doi:10.1016/j.tiv.2012.05.001
100. Lacerda L, Ali-Boucetta H, Herrero MA, et al. Tissue histology and physiology

- following intravenous administration of different types of functionalized multiwalled carbon nanotubes. *Nanomedicine*. 2008;3(2):149-161. doi:10.2217/17435889.3.2.149
101. Ji Z, Lin G, Lu Q, et al. Targeted therapy of SMMC-7721 liver cancer in vitro and in vivo with carbon nanotubes based drug delivery system. *J Colloid Interface Sci*. 2012;365(1):143-149. doi:10.1016/j.jcis.2011.09.013
 102. Berthomieu C, Hienerwadel R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynth Res*. 2009;101(2-3):157-170. doi:10.1007/s11120-009-9439-x
 103. Hussain S, Ji Z, Taylor AJ, et al. Multiwalled Carbon Nanotube Functionalization with High Molecular Weight Hyaluronan Significantly Reduces Pulmonary Injury. *ACS Nano*. 2016;10(8):7675-7688. doi:10.1021/acsnano.6b03013
 104. Vyazovkin S. Thermogravimetric Analysis: Characterization of Materials. *Charact Mater*. 2012;344-362. doi:https://doi.org/10.1002/0471266965.com029.pub2
 105. Bom D, Andrews R, Jacques D, et al. Thermogravimetric Analysis of the Oxidation of Multiwalled Carbon Nanotubes: Evidence for the Role of Defect Sites in Carbon Nanotube Chemistry. *Nano Lett*. 2002;2(6):615-619. doi:10.1021/nl020297u
 106. Ntim SA, Sae-Khow O, Desai C, Witzmann FA, Mitra S. Size dependent aqueous dispersibility of carboxylated multiwall carbon nanotubes. *J Environ Monit*. 2012;14(10):2772-2779. doi:10.1039/c2em30405h
 107. Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, et al. A critical review of the biological mechanisms underlying the *in vivo* and *in vitro* toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics. *Nanotoxicology*. 2010;4(2):207-246. doi:10.3109/17435390903569639

108. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* 1996;56(1):21-26. doi:8548765
109. Pérez-Trujillo JJ, Robles-Rodríguez OA, Garza-Morales R, et al. Antitumor Response by Endoplasmic Reticulum-Targeting DNA Vaccine Is Improved by Adding a KDEL Retention Signal. *Nucleic Acid Ther.* 2018;28(4):252-261. doi:10.1089/nat.2017.0717
110. Saucedo-Cárdenas O, García-Garza R, Ramírez-Durón R, et al. Invasion of TC-1 cells to skeletal muscle fibers protect them from peroxisomicine A1 (T-514) treatment in a murine model of cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2017;10(7):8062-8071.
111. Ryoo SR, Kim YK, Kim MH, Min DH. Behaviors of NIH-3T3 fibroblasts on graphene/carbon nanotubes: Proliferation, focal adhesion, and gene transfection studies. *ACS Nano.* 2010;4(11):6587-6598. doi:10.1021/nn1018279
112. Sharma CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, et al. Single-Walled Carbon Nanotubes Induces Oxidative Stress in Rat Lung Epithelial Cells. *J Nanosci Nanomater.* 2009;7(7):2466-2472. doi:10.1166/jnn.2007.431.Single-Walled
113. Cheng C, Müller KH, Koziol KKK, et al. Toxicity and imaging of multi-walled carbon nanotubes in human macrophage cells. *Biomaterials.* 2009;30(25):4152-4160. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.019
114. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: Gilbert DF, Friedrich O, eds. *Cell Viability Assays: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer New York; 2017:1-17. doi:10.1007/978-1-4939-6960-9_1

115. Stepanenko AA, Dmitrenko V V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*. 2015;574(2):193-203. doi:10.1016/j.gene.2015.08.009
116. Huang W, Wang Y, Luo G, Wei F. 99.9% Purity Multi-Walled Carbon Nanotubes By Vacuum High-Temperature Annealing. *Carbon N Y*. 2003;41(13):2585-2590. doi:10.1016/S0008-6223(03)00330-0
117. Haniu H, Saito N, Matsuda Y, et al. Manufacturing strategy for multiwalled carbon nanotubes as a biocompatible and innovative material. *J Nanotechnol*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/937819
118. Hasanzadegan Roudsari M, Saeidi N, Kabiri N, et al. Investigation of Characteristics and Behavior of Loaded Carboplatin on the, Liposomes Nanoparticles, on the Lung and Ovarian Cancer: An In-Vitro Evaluation. *Asian Pacific J Cancer Biol*. 2016;1(1):9. doi:10.31557/apjcb.2016.1.1.9-13
119. Poy D, Ebrahimi Shahemabadi H, Akbarzadeh A, Moradi-Sardareh H, Ebrahimifar M. Carboplatin liposomal nanoparticles: Preparation, characterization, and cytotoxicity effects on lung cancer in vitro environment. *Int J Polym Mater Polym Biomater*. 2018;67(6):367-370. doi:10.1080/00914037.2017.1332624
120. Arlt M, Haase D, Hampel S, et al. Delivery of carboplatin by carbon-based nanocontainers mediates increased cancer cell death. *Nanotechnology*. 2010;21(33). doi:10.1088/0957-4484/21/33/335101
121. Balas M, Constanda S, Duma-Voiculet A, et al. Fabrication and toxicity characterization of a hybrid material based on oxidized and aminated MWCNT loaded

- with carboplatin. *Toxicol Vitr.* 2016;37:189-200. doi:10.1016/j.tiv.2016.09.011
122. Feig DI, Sowerst LC, Loeb LA. Reverse chemical mutagenesis: Identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA (oxygen free radicals/DNA damage/carcinogens/mutagens/human immunodeficiency virus reverse transcriptase). *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(July):6609-6613. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC44252/pdf/pnas01136-0367.pdf>.
 123. Oberley TD. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol.* 1997;12(2):525-535. <https://www2.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0030988524&partnerID=40&md5=2473c8fda397bb8ac8787a07debef6f>.
 124. Vales G, Rubio L, Marcos R. Genotoxic and cell-transformation effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) following in vitro sub-chronic exposures. *J Hazard Mater.* 2016;306:193-202. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.12.021
 125. Cheng CF, Juan SH, Chen JJ, et al. Pravastatin attenuates carboplatin-induced cardiotoxicity via inhibition of oxidative stress associated apoptosis. *Apoptosis.* 2008;13(7):883-894. doi:10.1007/s10495-008-0214-9
 126. Galano A. Carbon nanotubes: Promising agents against free radicals. *Nanoscale.* 2010;2(3):373-380. doi:10.1039/b9nr00364a
 127. Fenoglio I, Tomatis M, Lison D, et al. Reactivity of carbon nanotubes: Free radical generation or scavenging activity? *Free Radic Biol Med.* 2006;40(7):1227-1233. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.010
 128. Ke C, Sun L, Qiao D, Wang D, Zeng X. Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(10):2670-2675.

doi:10.1016/j.fct.2011.07.020

129. Warnke R, Pederson M, Williams C, Levy R. A Study of Lymphoproliferative Diseases Comparing Immunofluorescence with Immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol.* 1978;70(6):867-875. doi:10.1093/ajcp/70.6.867
130. Morrison BJ, Steel JC, Morris JC. Sphere Culture of Murine Lung Cancer Cell Lines Are Enriched with Cancer Initiating Cells. *PLoS One.* 2012;7(11):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0049752
131. Alshaer W, Hillaireau H, Vergnaud J, Ismail S, Fattal E. Functionalizing Liposomes with anti-CD44 Aptamer for Selective Targeting of Cancer Cells. *Bioconjug Chem.* 2015;26(7):1307-1313. doi:10.1021/bc5004313
132. Karimi M, Solati N, Ghasemi A, et al. Carbon nanotubes part II: a remarkable carrier for drug and gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(7):1089-1105. doi:10.1517/17425247.2015.1004309
133. Jin H, Heller DA, Sharma R, Strano MS. Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: Single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles. *ACS Nano.* 2009;3(1):149-158. doi:10.1021/nn800532m
134. Maruyama K, Haniu H, Saito N, et al. Endocytosis of multiwalled carbon nanotubes in bronchial epithelial and mesothelial cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/793186
135. Boncel S, Müller KH, Skepper JN, Walczak KZ, Koziol KKK. Tunable chemistry and morphology of multi-wall carbon nanotubes as a route to non-toxic, theranostic systems. *Biomaterials.* 2011;32(30):7677-7686.

doi:10.1016/j.biomaterials.2011.06.055

136. Donnelly S, Walsh D. The symptoms of advanced cancer. *Semin Oncol.* 1995;22(2 Suppl 3):67-72.
137. Singh V, Singh SM. Effect of high cell density on the growth properties of tumor cells : a role in tumor cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Anticancer Drugs.* 2007;18:1123-1132.
138. Yang K, Liu Z. In vivo biodistribution, pharmacokinetics, and toxicology of carbon nanotubes. *Curr Drug Metab.* 2012;13(8):1057-1067.
doi:10.2174/138920012802850029
139. Thatishetty A V, Agresti N, O'Brien CB. Chemotherapy-Induced Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis.* 2013;17(4):671-686. doi:10.1016/j.cld.2013.07.010
140. Martino M Di, Pacifico L, Bezzi M, et al. Comparison of magnetic resonance spectroscopy , proton density fat fraction and histological analysis in the quantification of liver steatosis in children and adolescents. *World J Gastroenterol.* 2016;22(39):8812-8819. doi:10.3748/wjg.v22.i39.8812
141. Ali-Boucetta H, Kostarelos K. Pharmacology of carbon nanotubes: Toxicokinetics, excretion and tissue accumulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(15):2111-2119.
doi:10.1016/j.addr.2013.10.004
142. Ho GY, Woodward N, Coward JIG. Cisplatin versus carboplatin: Comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;102(2016):37-46. doi:10.1016/j.critrevonc.2016.03.014

143. Lacerda L, Soundararajan A, Singh R, et al. Dynamic imaging of functionalized multi-walled carbon nanotube systemic circulation and urinary excretion. *Adv Mater.* 2008;20(2):225-230. doi:10.1002/adma.200702334
144. Bhattacharya K, Mukherjee SP, Gallud A, et al. Biological Interactions of Carbon-Based Nanomaterials: From Coronation to Degradation. *Nanomedicine.* 2015;12(2):333-351.
145. Deng X, Jia G, Wang H, et al. Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. *Carbon N Y.* 2007;45(7):1419-1424. doi:10.1016/j.carbon.2007.03.035
146. Wang JTW, Rubio N, Kafa H, et al. Kinetics of functionalised carbon nanotube distribution in mouse brain after systemic injection: Spatial to ultra-structural analyses. *J Control Release.* 2016;224:22-32. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.039

ANEXOS

APENDICE A - PROCEDIMIENTOS

A.1 Técnica Histológica para inclusión de tejido en parafina.

- 1.- Obtención de la muestra.
- 2.- Fijación con formaldehído al 4 %.
- 3.- Lavado en agua corriente.
- 4.- Deshidratación en alcoholes graduales 60 – 100 %.
- 5.- Aclaración con xilol.
- 6.- Pre-inclusión (impregnación en parafina).
- 7.- Inclusión definitiva para la formación del bloque.
- 8.- Microtomía.
- 9.- Adhesión de los cortes en baño de flotación.
- 10.- Desparafinación e hidratación.
- 11.- Coloración o Tinción.
- 12.- Deshidratación y aclaración.
- 13.- Montaje con resina sintética.

A.2 Tinción con Hematoxilina y eosina (H y E).

- 1.- Desparafinación con xilol - 5 min.
- 2.- Etanol-Xilol - 5 min.

- 3.- Etanol absoluto - 2 min.
- 4.- Alcohol etílico 96° - 2 min.
- 5.- Agua destilada, enjuague lento.
- 6.- Hematoxilina de Gill - 2 min.
- 7.- Agua de la llave (2 lavados) - enjuague lento.
- 8.- Alcohol-Ácido - 1 inmersión rápida.
- 9.- Agua de la llave (2 lavados) - enjuague lento.
- 10.- Agua amoniacal - 2 inmersiones rápidas.
- 11.- Agua de la llave (2 lavados) - enjuague lento.
- 12.- Agua destilada - enjuague lento.
- 13.- Eosina - 6 inmersiones.
- 14.- Alcohol etílico 96° - enjuague breve.
- 15.- Alcohol etílico 96° - 1 min.
- 16.- Etanol absoluto (2 cambios) - 2 min.
- 17.- Etanol-Xilol - 3 min.
- 18.- Xilol - 2 min.
- 19.- Xilol - 3 min.
- 20.- Montaje con resina sintética o Entellan.

A.3 Técnica para inclusión en resinas epóxicas.

1.- Fijación en Karnovsky-Ito a temperatura ambiente 30 min a 1 hora.

2.- Lavado en buffer de cacodilatos 3 veces - 5 min cada lavado.

3.-Postifijación en tetraóxido de osmio 2% - 30 min.

4.- Lavado en buffer de cacodilatos 3 veces - 5 min cada lavado.

5.- Nitrato de uranilo acuoso 1% - 30 min.

6.- Lavado en buffer de cacodilatos 3 veces - 5 min cada lavado.

7.- Acetona 30% - 5 min.

8.- Acetona 50% - 5 min.

9.- Acetona 70% - 5 min.

10.- Acetona 90% - 5 min.

11.- Acetona 100% 3 veces por - 5 min.

12.- Acetona-Epón 1:1 1 h o toda la noche.

Dejar evaporar bajo campana de extracción por 4 hrs o hasta que la resina se vuelva más viscosa.

13.- Epón puro - 1 h.

14.- Inclusión y polimerización de 12 a 72 h a 60°C.

Se preparan dos tipos de cortes: A) Semi-finos: de aproximadamente 350 μm de grosor, se montan en un portaobjetos y se tiñen con azul de toluidina y se analizan mediante microscopia de luz. B) Finos: de aproximadamente 100 nm de grosor y se contrastan con soluciones acuosas de acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.4% para el análisis ultraestructural.

APENDICE B - SOLUCIONES

B.1 Formaldehído 4 %

* Para preparar 500 ml

Paraformaldehído	20 g
------------------	------

Agua destilada	450 ml
----------------	--------

* Calentar a 60 °C por 30 minutos

B.2 PBS 10 X

* Para preparar 100 mL

NaCl	8 g.
------	------

KCl	0.2 g.
-----	--------

Na_2HPO_4	1.44 g.
---------------------------	---------

KH_2PO_4	0.24 g.
--------------------------	---------

Ajustar pH a 7.2

Almacenar a 4 °C.

B.3 PBS 1X

* Para preparar 500 ml

PBS 10X	50 ml
---------	-------

Agua destilada	450 ml
----------------	--------

Ajustar pH a 7.2

Almacenar a 4 °C.

B.4 Glutaraldehído 2.5 %

Glutaraldehído 25 %	10 ml
---------------------	-------

Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.4	90 ml
------------------------------------	-------

B.5 Buffer de Cacodilatos 0.1 M pH 7.4

Solución A

Cacodilato de Sodio	4.28 g.
---------------------	---------

Agua destilada	100 ml
----------------	--------

Solución B

Ácido Clorhídrico	0.5 ml
-------------------	--------

Agua destilada	25 ml
----------------	-------

Solución de trabajo

Solución A	100 ml
------------	--------

Solución B	5.4 ml
------------	--------

Aforar a 200 mL con agua destilada.

B.6 Tetraóxido de osmio 2 %

Tetraóxido de osmio	1 g.
---------------------	------

Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.4	50 mL
------------------------------------	-------

B.7 Nitrato de uranilo acuoso 1%

Nitrato de uranilo	1 g.
--------------------	------

Aforara a 100 mL

B.8 Resina epóxica

En este estudio se preparó resina epóxica MEDIA

Resina	23.8 ml (29 g)
--------	----------------

DDSA	16.0 ml (16 g)
------	----------------

NMA	11.5 ml (14.3 g).
-----	-------------------

DMP 30	1 ml (1 g).
--------	-------------

B.9 Azul de Toluidina 5 %

Borato de sodio (Borax)	5 g.
-------------------------	------

Agua destilada	100 ml
----------------	--------

* Se calienta hasta que se disuelva completamente

Azul de toluidina	1 g.
-------------------	------

* Se agrega la solución de borato de sodio, se agita para disolver y se filtra.

B.10 Acetato de uranilo 5 % en alcohol etílico 50 %

Acetato de uranilo	0.5 g.
--------------------	--------

Alcohol etílico 50 %	10 ml
----------------------	-------

* Se guarda en refrigeración y se protege de la luz con papel aluminio.

B.11 Citrato de plomo 0.4 %

Citrato de plomo	0.04 g.
------------------	---------

Agua destilada	10 ml
----------------	-------

Se añaden unas gotas de hidróxido de sodio 1N hasta disolver.

B.12 Hematoxilina de Gill.

Agua destilada	730 ml
----------------	--------

Etilenglicol	250 ml
--------------	--------

Hematoxilina anhidra (polvo)	2.0 g.
------------------------------	--------

* Si está en cristales pesar	2.36 g.
------------------------------	---------

Yodato de Sodio	0.2 g.
-----------------	--------

Sulfato de aluminio	17.6 g.
---------------------	---------

Ácido acético glacial	2.0 ml
-----------------------	--------

* Para la preparación se debe seguir el orden, en agitación, a temperatura ambiente por 1 hora, filtrar antes de usar por primera vez.

B.13 Eosina.

Solución stock (concentrada):

Eosina amarillenta	1.0 g.
Agua destilada	20 ml
Alcohol del 96°	80 ml

Solución de trabajo:

Tomar una parte de la solución stock y agregarla en tres partes de alcohol de 80 °C. Antes de usar agregar 0.5 ml de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

B.14 Solución de Alcohol-Ácido (Diferenciador o decolorante).

Alcohol de 70°	99 ml
Ácido Clorhídrico (HCl)	1 ml

B.15 Solución de Agua Amoniacal (Virador).

Agua destilada	99 ml
Hidróxido de Amonio	1 ml

B.16 Hematoxilina Férrica de Weigert

Solución A

Hematoxilina (anhidra)	1 g.
------------------------	------

Alcohol de 96°	100 ml
----------------	--------

Solución B

Cloruro férrico acuoso al 29 %	4 ml
--------------------------------	------

Agua destilada	95 ml
----------------	-------

Ácido clorhídrico conc.	1 ml
-------------------------	------

Solución de trabajo:

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B. (Debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y de consistencia, con el tiempo suele precipitarse).

* Solución acuosa de Cloruro Férrico

Cloruro férrico	14.5 g.
-----------------	---------

Agua destilada	50 ml
----------------	-------

APENDICE C – CURRÍCULUM VITAE

DATOS PERSONALES

Nombre, Edad: Daniel Salas Treviño, 29 años

Celular: 044-818-256-33-99

Correo electrónico: danielsalast91@gmail.com

GRADOS ACADÉMICOS

- **Licenciatura en Químico Clínico Biólogo.** Facultad de Medicina, UANL. Egresado con **Mención honorífica.** (2008 – 2013)
- **Maestría en Ciencias con Orientación en Morfología.** Facultad de Medicina, UANL. (2014 – 2016)
- **Doctorado en Ciencias con Orientación en Morfología.** Facultad de Medicina, UANL. (2016 – En curso, Terminación en 2020)

EXPERIENCIA PROFESIONAL

Puesto/Posición	Lugar	Descripción	Tiempo invertido
Investigador/Estudiante de Doctorado	Departamento de Histología, Facultad de Medicina, UANL.	Desarrollo del proyecto de tesis doctoral, actividad docente nivel licenciatura materia “histología”. Colaboración activa en diversas líneas de investigación académica. Docencia en la materia de “Biología Celular y Tisular” de la carrera Médico Cirujano y Partero.	Agosto 2016 – Presente
Investigador/Estudiante de Maestría	Departamento de Patología, Facultad de	Elaboración del proyecto de tesis de maestría. Actividad como docente en las materias de “Biología celular” y “Biología	Agosto 2014 – Julio 2016.

	Medicina, UANL.	de la reproducción” de la carrera Químico Clínico Biólogo.	
Químico Analista	Swiss Hospital SMG	Toma de muestras clínicas y desarrollo de Análisis clínicos en las áreas de Hematología, Química Clínica, Urianálisis, Banco de Sangre, Serologías y Parasitología.	Agosto 2013 – marzo 2015
Químico Analista	Biomedición Clinicus, S.A. de C.V.	Toma de muestras clínicas y desarrollo de Análisis clínicos en las áreas de Hematología, Química Clínica, Urianálisis, Banco de Sangre, Serologías, Parasitología y Hormonas	Noviembre 2012 – agosto 2013

HABILIDADES TÉCNICAS

- ✓ Manejo de equipos de laboratorio clínico analítico de todas las áreas hospitalarias (Hematología, Química Clínica, Urianálisis, Serologías, Parasitología y Banco de Sangre)
- ✓ Planeación, desarrollo e interpretación de técnicas moleculares como PCR, Western Blot y FISH.
- ✓ Desarrollo de técnicas de cultivo celular para su aplicación en ensayos preclínicos de viabilidad, citotoxicidad, estudios moleculares, identificación de proteínas por Western Blot e inmunohistoquímica.
- ✓ Técnicas histológicas generales y especializadas como inmunohistoquímica o citogenética.
- ✓ Manejo de microscopia óptica especializada (contraste de fases, campo oscuro) y electrónica de transmisión.
- ✓ Experiencia y facilidad de redacción de manuscritos científicos, instructivos, manuales de procedimientos y organización del laboratorio, basados en la estandarización de los procesos de trabajo.

- ✓ Planeación y desarrollo de técnicas en química analítica como HPLC, cromatografía de gases, espectrofotometría UV y de masas.

RECONOCIMIENTOS.

- ✓ Nombramiento del Estudiante de Posgrado Distinguido en el Doctorado en Ciencias con Orientación en Morfología en el año 2018.
- ✓ Nombramiento al Estudiante de Posgrado Distinguido en la Maestría en Ciencias con Orientación en Morfología en el año 2016.
- ✓ Mérito académico por tener el mejor promedio de los egresados de la carrera de Químico Clínico Biólogo en la Generación 2008-2013.
- ✓ Mención honorífica por trayectoria sobresaliente durante la carrera de “Químico Clínico Biólogo en la Generación 2008-2013.

ARTICULOS PUBLICADOS

Revista	Título	Mes y Año de Publicación
Acta Veterinaria Hungarica	Expression of WT1 gene (Wilms' Tumor) and its association with PPAR- β/δ in healthy and melanoma skin of equine.	Julio 2020 (Aceptado: en prensa)
Biotechnic & Histochemistry	Fast acetone tissue processing of human organs provides tissue characteristics equal to conventional processing.	Junio 2020
Nanomaterials	Hyaluronate Functionalized Multi-Wall Carbon Nanotubes Filled with Carboplatin as a Novel Drug Nanocarrier against Murine Lung Cancer Cells. (Artículo original derivado de esta tesis)	Noviembre - 2019
International Journal of Morphology	WT1 expression as a Potential Biomarker of Malignancy on Canine Breast Tumor	Enero - 2018
Journal of BUON	Carbon nanotubes: An alternative for platinum-based drugs delivery systems. (Artículo de revision derivado de esta tesis)	Mayo - 2017

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Congreso	Tema	Modalidad	Lugar y Fecha
XXX Congreso Nacional de Investigación en Medicina	Análisis del efecto antineoplásico <i>in vitro</i> de un nanodispositivo grafénico modificado con hialuronato y cargado con carboplatino	Ponencia Oral	Monterrey, N.L. octubre 2019
XLV Congreso de la Academia Nacional de Medicina	Análisis del efecto antineoplásico <i>in vitro</i> de un nanodispositivo grafénico modificado con hialuronato y cargado con carboplatino.	Póster	Monterrey, N.L. octubre 2018
XXVII Congreso Nacional de Anatomía	Análisis <i>in vitro</i> del efecto antitumoral de un nanodispositivo grafénico cargado con carboplatino y modificado con hialuronato y quitosán.	Ponencia oral	Monterrey, N.L. octubre 2018
XXIX Congreso Nacional de Investigación en Medicina	Comparación de los parámetros morfológicos de glándulas humanas procesadas por deshidratación convencional vs técnica de acetona	Ponencia oral	Monterrey, N.L. octubre 2017
XLI Congreso anual de Microbiología e Infectología Clínica	Evaluación de una técnica citológica en fresco (cifar – cf) para el diagnóstico presuntivo de infección genitourinaria por el virus de papiloma humano y/o <i>Chlamydia trachomatis</i> en mujeres infértiles	Póster	Monterrey, N.L. mayo 2016
XXVIII Congreso Nacional de Investigación en Medicina	Prevalencia de VPH y genotipos de alto riesgo para cáncer cervicouterino en mujeres con infertilidad.	Póster	Monterrey, N.L. octubre 2015

XL Congreso Anual de Infectología y Microbiología Clínica	Utilidad de una técnica citológica en fresco de alto contraste y alta resolución en el diagnóstico presuntivo del virus del papiloma humano en pacientes con alteraciones reproductivas.	Póster	San Luis Potosí, San Luis Potosí. Mayo 2015.
XXVI CONGRESO NACIONAL DE INVESTIGACION EN MEDICINA	Presencia de <i>Chlamydia trachomatis</i> en exudado conjuntival y faríngeo de una población suburbana del área metropolitana de Monterrey.	Póster	Monterrey, N.L. septiembre 2012.
XXXV Congreso Anual del Colegio Mexicano de Urología Nacional	Medición intraespermática de ERO y rupturas del ADN en hombres con infección genitourinaria ocasionada por <i>Chlamydia</i> .	Póster	Puerto Vallarta, Jal. Abril 2011.



Article

Hyaluronate Functionalized Multi-Wall Carbon Nanotubes Filled with Carboplatin as a Novel Drug Nanocarrier against Murine Lung Cancer Cells

Daniel Salas-Treviño ¹, Odila Saucedo-Cárdenas ^{1,2}, Maria de Jesús Loera-Arias ¹, Humberto Rodríguez-Rocha ¹ , Aracely García-García ¹, Roberto Montes-de-Oca-Luna ¹, Edgar I. Piña-Mendoza ¹, Flavio E. Contreras-Torres ³ , Gerardo García-Rivas ⁴ and Adolfo Soto-Domínguez ^{1,*}

¹ Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey C.P. 64460, Mexico; qcbdanisalas@outlook.es (D.S.-T.); odilam@hotmail.com (O.S.-C.); marichu_loera@yahoo.com.mx (M.d.J.L.-A.); humbertordz54@gmail.com (H.R.-R.); Aracely_79_20@yahoo.com (A.G.-G.); rrrmontes@yahoo.com (R.M.-d.-O.-L.); edgar.pinamen@gmail.com (E.I.P.-M.)

² Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) del IMSS, Monterrey C.P. 64720, Mexico

³ Escuela de Ingeniería y Ciencias, Tecnológico de Monterrey, Monterrey C.P. 64849, Mexico; contreras.flavio@tec.mx

⁴ Escuela de Medicina, Tecnológico de Monterrey, Monterrey 64849, Mexico; gdejesus@tec.mx

* Correspondence: ibqasoto@yahoo.com.mx; Tel: +52-(81)-8329-4195

Received: 24 September 2019; Accepted: 26 October 2019; Published: 6 November 2019



Abstract: Carbon nanotubes (CNTs) have emerged in recent years as a potential option for drug delivery, due to their high functionalization capacity. Biocompatibility and selectivity using tissue-specific biomolecules can optimize the specificity, pharmacokinetics and stability of the drug. In this study, we design, develop and characterize a drug nanovector (oxCNTs-HA-CPT) conjugating oxidated multi-wall carbon nanotubes (oxCNTs) with hyaluronate (HA) and carboplatin (CPT) as a treatment in a lung cancer model in vitro. Subsequently, we exposed TC-1 and NIH/3T3 cell lines to the nanovectors and measured cell uptake, cell viability, and oxidative stress induction. The characterization of oxCNTs-HA-CPT reveals that on their surface, they have HA. On the other hand, oxCNTs-HA-CPT were endocytosed in greater proportion by tumor cells than by fibroblasts, and likewise, the cytotoxic effect was significantly higher in tumor cells. These results show the therapeutic potential that nanovectors possess; however, future studies should be carried out to determine the death pathways involved, as well as their effect on in vivo models.

REVIEW ARTICLE

Carbon nanotubes: An alternative for platinum-based drugs delivery systems

Daniel Salas-Trevino¹, Odila Saucedo-Cardenas^{1,2}, Maria de Jesus Loera-Arias¹, Edgar Gerardo De Casas-Ortiz³, Humberto Rodriguez-Rocha¹, Aracely Garcia-Garcia¹, Roberto Montes-de-Oca-Luna¹, Adolfo Soto-Dominguez¹

¹Department of Histology, Faculty of Medicine, Autonomous University of Nuevo Leon, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico;

²Northeast Biomedical Research Center (CIBIN) of the IMSS, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico; ³Department of Advanced Materials, Applied Chemistry Research Center (CIQA), Saltillo, Coahuila, Mexico

Summary

Currently, nanomedicine is approaching the research of nanomaterials that could work as drug delivery systems, to increase the efficiency, specificity and safety of drugs reducing toxicity and side effects. In this regard, carbon nanotubes have acquired great interest due to their physicochemical properties. The use of platinum-based drugs is facing some troubles in the clinic due to their side effects such as nephrotoxicity, neutropenia, neurotoxicity, among others. In addition, cases of tumors resistant to these drugs have been recently observed. The goal of this review was to analyze

the reports about the use of formulations of platinum-based drugs in carbon nanotubes, to know and establish the most functional and potential conditions for its use in cancer treatment, identifying perspectives and develop areas for the improvement of these nanomaterials in the application of cancer therapy.

Key words: cancer, carbon nanotubes, drug delivery, chemotherapy, platinum-based drugs

WT1 Expression as a Potential Biomarker of Malignancy in Canine Breast Tumor

La Expresión de WT1 como un Biomarcador Potencial
Maligno en un Tumor de Mama Canino

Brisa D. Carranza-Martínez¹; Daniel Salas-Treviño²; Adolfo Soto-Domínguez²;
Rafael Ramírez-Romero¹; Pablo Zapata-Benavides³; Sibilina Cedillo-Rosales⁴;
Juan José Zárate-Ramos⁵; Odila Saucedo-Cárdenas^{2,6} & Diana E. Zamora-Ávila¹

CARRANZA-MARTÍNEZ, B. D.; SALAS-TREVIÑO, D.; SOTO-DOMÍNGUEZ, A.; RAMÍREZ-ROMERO, R.; ZAPATA-BENAVIDES, P.; CEDILLO-ROSALES, S.; ZÁRATE-RAMOS, J. J.; SAUCEDO-CÁRDENAS, O. & ZAMORA-ÁVILA, D. E. WT1 expression as a potential biomarker of malignancy in canine breast tumor. *Int. J. Morphol.*, 37(1):190-195, 2019.

SUMMARY: Veterinary oncology is very important nowadays to get a better understanding of human carcinogenesis. Estrogen receptor, progesterone receptor and Human Epidermal Growth Factor receptor 2 are frequently evaluated by immunohistochemistry (IHC) in human breast tumor. WT1 is an oncogene, its overexpression has been detected in leukemia and diverse solid tumors like breast cancer, lung cancer and mesothelioma in humans. WT1 expression was evaluated in 15 canine breast tumors (CBT) diagnosed by histopathological analysis to find its relationship with neoplasia and malignancy. IHC and RT-PCR were performed in CBT tissues. Fisher's test was used to analyze WT1 relationship with malignancy. Of the 15 tumors, 9 (60 %) were diagnosed as benign and 6 (40 %) were malignant. With IHC, WT1 expression was positive only in biopsies diagnosed as malignant. Expression of WT1 by RT-PCR was detected in 14 of the 15 tumors (93.33 %) as well as in control healthy mammary gland. Clinical significance: This study describes for the first time a close correlation between CBT and a positive result for WT1 expression with IHC; hence, it can be used as a biomarker for this neoplasia and as an indicator of malignancy. RT-PCR analysis also showed to be good option to detect WT1 expression. These results will be useful to further investigations to elucidate WT1-related signaling pathways in CBT. Also to know molecules that regulate the translation of this protein as a marker for tumor progression.

ARTICLES



Fast acetone tissue processing of human organs provides tissue characteristics equal to conventional processing

R. García-Garza^a, D. Salas-Treviño^b, F. A. Soto-Patiño^c, E. A. González-Murillo^c, E. E. Castelán-Maldonado^c, O. Saucedo-Cárdenas^{b,d}, V. J. Romero-Díaz^b, S.E. Velázquez-Gauna^e, and A. Soto-Domínguez^b

^aDepartment of Histology, Faculty of Medicine, Autonomous University of Coahuila, Torreón, Coah, México; ^bDepartment of Histology, Faculty of Medicine, Autonomous University of Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México; ^cDepartment of Pathological Anatomy, Northeast National Medical Center, Mexican Institute of Social Security, Monterrey, Nuevo León, México; ^dDepartment of Molecular Genetics, Northeast Biomedical Research Centre of the Mexican Institute of Social Security, Monterrey, Nuevo León, México; ^eDepartment of Embryology, Faculty of Medicine, Autonomous University of Coahuila, Torreón, Coah, México

ABSTRACT

Routine preparation of paraffin embedded tissue for histopathological diagnosis, here termed conventional histological technique (CT), whether performed manually or using an automated system, requires approximately 12 h. We developed earlier a rapid acetone dehydration technique (AT) for processing biopsies of nervous tissue that meets requirements for preserving tissue morphology and staining properties, and reduces processing time to 3.3 h. We compared the morphology and staining properties of human organ biopsies including adrenal gland, liver, ovary, pancreas, prostate, testis and thyroid prepared using both AT and CT. Following fixation with 10% formaldehyde and processing by either AT or CT, sections were stained using routine and special staining, and immunohistochemical methods. We evaluated nuclear and cytoplasmic staining, staining intensity, sharpness of images and presence of artifacts such as cracking and folding. AT preserved the morphology and staining properties of the tissues as well as CT. Consequently, the rapid AT procedure is a promising alternative technique for tissue processing.

KEYWORDS

Acetone; conventional processing; histochemistry; human; immunohistochemistry; organs; tissue processing